



Brevet d'invention

Certificat d'utilité

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 16 JUIN 2010

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
La Directrice des brevets

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. Planche', enclosed within a large, horizontal, oval-shaped flourish.

Martine PLANCHE

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

DATE DE REMISE DES PIÈCES N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT DATE DE DÉPÔT		9 JUIL 1999 9908939 75 INPI PARIS 0 9 JUIL. 1999		1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE CABINET HARLE ET PHELIP 7, rue de Madrid 75008 PARIS FRANCE	
2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n°				n° du pouvoir permanent : FR 61616 K références du correspondant : 0153046464 date :	
Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non					
Titre de l'invention (200 caractères maximum) Procédé de préparation du 1,3-propanediol par un micro-organisme recombinant en l'absence de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.					
3 DEMANDEUR (S) n° SIREN : code APE-NAF : Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination 1/ INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA) 2/ INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE 3/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE				Forme juridique Etablissement public Etablissement public Etablissement public	
Nationalité (s) FR Adresse (s) complète (s) 1/ 147, rue de l'Université - 75341 PARIS CEDEX 07. 2/ Complexe Scientifique de Rangueil - 31077 TOULOUSE CEDEX 4 3/ 3, rue Michel Ange - 75794 PARIS CEDEX 16				Pays FRANCE FRANCE FRANCE	
4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée					
5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission					
6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE					
pays d'origine		numéro		date de dépôt	
				nature de la demande	
7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date					
8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) MICHELET Alain C.P.I. bm (92-1176 i) Cabinet HARLE ET PHELIP		SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION		SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI	

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

9908939

TITRE DE L'INVENTION :

Procédé de préparation du 1,3-propanediol par un micro-organisme recombinant en l'absence de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

1/ INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

2/ INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES DE TOULOUSE

3/ CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

SARCABAL Patricia

Résidence Colbert, Appartement 30

80, rue du Midi - 31400 TOULOUSE

CROUX Christian

1 bis, Allée des Aubépines - 31320 CASTANET TOLOSAN

SOUCAILLE Philippe

Chant du Coucou - 31450 DEYME

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

MICHELET Alain
C.F.Y. 6m (92-1176 I)
Cabinet HARLE ET PHELIP

PARIS, LE 09 JUILLET 1999

La présente invention concerne un procédé de préparation du 1,3-propanediol à partir d'une substance carbonée, ledit procédé comportant une étape de culture d'un micro-organisme recombinant non producteur de coenzyme B12 en l'absence d'ajout de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

5 L'invention concerne aussi un acide nucléique codant pour une glycérol deshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs ainsi qu'un acide nucléique codant une 1,3-propanol déshydrogénase intervenant dans la synthèse du 1,3-propanediol.

10 L'invention est également relative à des vecteurs et cellules hôtes recombinants comprenant de tels acides nucléiques ainsi qu'aux polypeptides codés par ces derniers.

Le 1,3-propanediol est un composé d'un grand intérêt industriel, principalement mis en oeuvre dans l'industrie des détergents et dans celle des polymères.

15 Ainsi, le 1,3-propanediol est utilisé dans les lessives liquides en tant qu'agent stabilisant des lipases, amylases et protéases ainsi que comme « adoucissant protecteur » dans les détergents liquides pour lavage à la main de la vaisselle.

20 Par ailleurs, le 1,3-propanediol est utilisé de manière croissante dans l'industrie des polymères, plus particulièrement en tant que monomère de synthèse de polyesters, polyéthers, ou polyuréthanes.

Actuellement, la production de 1,3-propanediol est réalisée principalement par synthèse chimique par hydratation (en milieu acide) d'acroléine en 3-hydroxypropionaldéhyde, lequel est ensuite réduit par hydrogénation catalytique en 1,3-propanediol.

25 Un tel procédé est coûteux et met en oeuvre un produit toxique, l'acroléine. De plus, cette synthèse est peu sélective et génère un grand nombre de composés secondaires non utilisables.

30 Une autre voie de synthèse consiste en l'hydrocarbonylation d'oxyde d'éthylène par le monoxyde de carbone et l'hydrogène sous haute pression en présence de catalyseurs et solvants.

Une telle réaction produit un dioxane qui est ensuite hydrogéné en 1,3-propanediol. Ce second procédé de synthèse chimique est également très coûteux.

Depuis quelques années, une alternative à la production de 1,3-propanediol par synthèse chimique a fait l'objet de différents travaux: il s'agit de la bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol par certaines souches bactériennes telles que *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Lactobacillus* et
5 *Pelobacter*.

En particulier, la conversion du glycérol en 1,3-propanediol chez les bactéries anaérobies facultatives telles que les bactéries du genre *Klebsiella*, du genre *Citrobacter* ou encore *Enterobacter agglomerans* a été étudiée.

Ainsi, des essais de clonage des gènes codant pour des enzymes
10 responsables de la conversion du glycérol en 1,3-propanediol ont-ils été tentés à partir de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*.

Plus particulièrement, le clonage des gènes codant pour deux enzymes a été recherché, respectivement une glycérol déshydratase qui catalyse la conversion du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde, et une 1,3-propanediol
15 déshydrogénase qui catalyse la conversion du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde en 1,3-propanediol.

Les brevets US 5,633,362 et 5,821,092 décrivent le clonage d'un fragment génomique d'environ 35 kb de la bactérie *Klebsiella pneumoniae*, ledit fragment d'ADN contenant une séquence codant pour une diol déshydratase
20 active. Un tel fragment génomique a été obtenu par criblage de plusieurs banques de cosmides des espèces bactériennes *Klebsiella pneumoniae* et *Klebsiella aerogenes*.

Il est décrit dans ces brevets que des souches de *E. Coli* DH5 α ont été transformées avec ces cosmides et les bactéries transformantes criblées pour leur
25 capacité à convertir le glycérol en 1,3-propanediol. Une faible production de 1,3-propanediol a été observée chez certains clones de bactéries transformantes. Il en a été déduit que la diol déshydratase codée par les cosmides sélectionnés pourrait être responsable de la conversion du glycérol en 1,3-propanediol observée.

30 Néanmoins, la production de 1,3-propanediol par les souches de *E. coli* DH5 α transformées par les cosmides sélectionnés nécessitait obligatoirement la présence de vitamine B12 ou de l'un de ses précurseurs dans le milieu de culture bactérien.

De plus, la durée de fermentation nécessaire à la détection d'une production de 1,3-propanediol était très longue (de 78 à 132 heures) et le niveau de production du 1,3-propanediol très faible.

Le brevet US N°5,686,276 au nom de DU PONT DE NEMOURS & COMPANY décrit un procédé permettant la bioconversion du D-glucose en 1,3-propanediol par une souche de *E.coli* transformée par de l'ADN de cosmide originaire de *Klebsiella pneumoniae*. A nouveau, la production de 1,3-propanediol nécessite l'utilisation de milieux de culture adaptés aux cellules de *E. coli* transformée par un cosmide de *Klebsiella pneumoniae* contenant de la vitamine B12, par exemple à la concentration de 800µg/ml.

Les niveaux de production de 1,3-propanediol observés étaient très faibles, de l'ordre de 0,5 g/l à 10 g/l.

La présence de vitamine B12 dans le milieu de culture des cellules transformées avec l'ADN de *Klebsiella pneumoniae* des brevets US cités ci-dessus est obligatoire du fait que le coenzyme B12 est un cofacteur nécessaire à l'activité catalytique de la glycérol déshydratase de *Klebsiella pneumoniae*.

Le coenzyme B12, ou l'un quelconque de ces précurseurs, tel que la vitamine B12, est un composé excessivement coûteux et peu stable, ce qui rend difficile, voire impossible, la transposition à l'échelle industrielle des procédés de conversion du glucose ou du glycérol en 1,3-propanediol par fermentation bactérienne à l'aide de telles souches.

En outre, le coenzyme B12 et ses précurseurs traversent difficilement les parois membranaires de certains micro-organismes, telles que les levures, ce qui nécessite la présence de très hautes concentrations de ces composés dans le milieu de culture afin qu'ils soient accessibles aux enzymes intracellulaires dont le coenzyme B12 est le cofacteur.

Par ailleurs, une alternative qui consisterait à introduire l'ADN codant pour les glycérol déshydratases connues, intervenant dans la conversion du glycérol en 1,3-propanediol, dans des bactéries synthétisant la vitamine B12 se heurterait à des obstacles techniques considérables.

En effet, seules certaines espèces bactériennes synthétisent naturellement la vitamine B12, telles que les bactéries *Pseudomonas* ou encore les propionibactéries, dont la génétique est très peu connue et qui sont donc peu aptes à subir des modifications génétiques.

D'autres bactéries synthétisant naturellement la vitamine B12, dont la génétique est mieux connue, telle que *Klebsiella pneumoniae*, présentent d'importants problèmes de toxicité, ce qui les rend peu aptes à une utilisation dans l'industrie.

5 Outre ce premier désavantage, seule une faible production de 1,3-propanediol a pu être obtenue après transformation de *Klebsiella pneumoniae*. Ainsi, la demande PCT N°WO 98/21 339 décrit des *Klebsiella pneumoniae* recombinantes exprimant à la fois les gènes de métabolisation du glucose en glycérol et les gènes de métabolisation du glycérol en 1,3-propanediol. La
10 production de 1,3-propanediol observée à partir de glucose était faible, de l'ordre de 10g par litre.

Les obstacles techniques à la mise au point d'un procédé de bioconversion d'une substance carbonée en 1,3-propanediol mentionnés ci-dessus, ont été surmontés par l'invention.

15 Le demandeur a en effet isolé et caractérisé un acide nucléique qui code pour une glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de coenzyme B12 ou de l'un quelconque de ces précurseurs.

Les gènes codant pour la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 ont été isolés par le demandeur à partir du génome de la bactérie
20 *Clostridium butyricum* VPI 1718. Ils codent pour une protéine dimérique constituée de deux sous-unités protéiques, respectivement les polypeptides ORF11 et ORF12.

Il a été montré selon l'invention que les séquences codant pour les polypeptides ORF11 et ORF12 sont localisées sur un opéron unique dans le
25 génome de *Clostridium butyricum*, ledit opéron comprenant également, en aval de la séquence nucléique codant pour la sous-unité ORF12, une région codant pour une 1,3-propanediol déshydrogénase.

L'opéron selon l'invention comprend, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3, un promoteur de la transcription, la séquence *orf11* codant pour ORF11, la
30 première sous-unité de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12, la séquence *orf12*, codant pour ORF12, la seconde sous-unité de la glycérol déshydratase et une séquence *dhaT*, codant pour une nouvelle 1,3-propanediol déshydrogénase (DHAT).

Ainsi, les séquences nucléiques codant pour les deux sous-unités
35 protéiques de la glycérol déshydratase et pour la 1,3-propanediol déshydrogénase

font partie d'un opéron unique, les trois séquences codantes étant co-régulées par une séquence promotrice unique située du côté 5' de la séquence codant pour la sous-unité ORF11.

Il a en outre été montré selon l'invention que la transformation d'un hôte
5 cellulaire bactérien avec une séquence comprenant les régions codant respectivement pour ORF11, ORF12 et DHAT était de nature à conférer à l'hôte cellulaire transformé la capacité de produire le 1,3-propanediol à partir du glucose ou du glycérol en l'absence du coenzyme B12 ou de l'un quelconque de ses précurseurs, lorsque ces séquences sont placées sous le contrôle d'un promoteur
10 approprié, fonctionnel dans l'hôte cellulaire dans lequel l'expression de ces séquences est recherchée.

Le demandeur a également montré que la transformation d'un hôte cellulaire bactérien produisant naturellement le 1,3-propanediol par les séquences codant pour les deux sous-unités de la glycérol déshydratase selon l'invention
15 était de nature à induire une augmentation significative de la production de propanediol chez les hôtes bactériens recombinants obtenus .

L'invention a donc pour objet un procédé de préparation du 1,3-propanediol à partir d'une substance carbonée, ledit procédé comportant au moins une étape de culture d'un micro-organisme recombinant dans lequel a été
20 intégré au moins un acide nucléique codant pour les deux sous-unités d'une glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de coenzyme B12 ou l'un de ses précurseurs.

Avantageusement, la glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence du coenzyme B12 provient de la bactérie
25 *Clostridium butyricum*.

De manière préférentielle, la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 est une protéine dimérique composée d'un premier polypeptide ayant au moins 50% d'identité en aminoacides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°6 et d'un second polypeptide ayant au moins 50% d'identité en
30 aminoacides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°7. De manière tout à fait avantageuse, la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 est composée d'un premier et d'un second polypeptide ayant au moins 60%, 65%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95% ou encore 99% d'identité en aminoacides avec respectivement le polypeptide de séquence SEQ ID N°6 et le polypeptide de
35 séquence SEQ ID N°7.

Le « pourcentage d'identité » de nucléotides ou d'acides aminés entre deux séquences, au sens de la présente invention, peut être déterminé en comparant deux séquences alignées de manière optimale, à travers une fenêtre de comparaison.

5 La partie de la séquence nucléotidique ou peptidique dans la fenêtre de comparaison peut ainsi comprendre des additions ou des délétions (par exemple des « gaps ») par rapport à la séquence de référence (qui ne comprend pas ces additions ou ces délétions) de manière à obtenir un alignement optimal des deux séquences.

10 Le pourcentage d'identité est calculé en déterminant le nombre de positions auxquelles une base nucléique ou un acide aminé identique est observé pour les deux séquences comparées, puis en divisant le nombre de positions auxquelles il y a identité entre les deux bases ou les deux acides aminés, par le nombre total de positions dans la fenêtre de comparaison, puis en multipliant le
15 résultat par cent afin d'obtenir le pourcentage d'identité de séquences.

L'alignement optimal des séquences pour la comparaison peut être réalisé de manière informatique à l'aide d'algorithmes connus (par exemple le logiciel FASTA de la Société WISCONSIN GENETICS SOFTWARE PACKAGE, GENETICS COMPUTER GROUP (GCG), 575 Science Doctor, Madison,
20 WISCONSIN).

A titre d'illustration, le pourcentage d'identité de séquence pourra être calculé à l'aide du logiciel précité FASTA, en utilisant exclusivement les paramètres par défaut.

25 Les différences en acides aminés que peut comprendre un polypeptide selon l'invention par rapport à la séquence en acides aminés de référence, telle que définie dans le listage de séquences présenté à la fin de la présente description, peut résulter en des substitutions, délétions ou additions d'un ou plusieurs acides aminés consécutifs ou non.

Selon un autre aspect du procédé selon l'invention, le micro-organisme
30 recombinant comprend en outre un acide nucléique codant une 1,3-propanediol déshydrogénase, de préférence une 1,3-propanediol déshydrogénase de *Clostridium butyricum*.

De manière préférée, la 1,3-propanediol déshydrogénase est un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en aminoacides avec le polypeptide de
35 séquence SEQ ID N°8.

De manière tout à fait avantageuse, l'invention concerne aussi un polypeptide ayant au moins 85%, 90%, 95% ou 99% d'identité en aminoacides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°8.

Une caractéristique essentielle du procédé selon l'invention est que l'étape de culture du micro-organisme recombinant est effectuée en l'absence de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

Selon encore un autre aspect, le procédé est en outre caractérisé en ce que la source carbonée est choisie parmi les osides et les polyols.

L'oside peut être par exemple le glucose.

Le polyol peut être par exemple le glycérol.

Préférentiellement, le procédé selon l'invention est mis en oeuvre avec un micro-organisme choisi parmi les micro-organismes ne produisant pas naturellement le coenzyme B12 ou l'un de ses précurseurs.

Un tel micro-organisme peut être une bactérie appartenant au genre *Clostridium* ou *Escherichia*.

Il peut s'agir également d'une levure de l'espèce *Saccharomyces cerevisiae*.

Selon un mode de réalisation particulier, le procédé est en outre caractérisé en ce que le micro-organisme recombinant comprend également des acides nucléiques codant respectivement une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et une glycérol-3-phosphatase, auquel cas le micro-organisme recombinant est capable de convertir à haut rendement une source carbonée telle que le glucose en 1,3-propanediol.

L'invention a en outre pour objet un acide nucléique comprenant tout ou partie d'un polynucléotide codant pour au moins une sous-unité d'une glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de coenzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

De préférence, un acide nucléique selon l'invention se présente sous une forme purifiée ou isolée.

Un tel polynucléotide aura préférentiellement au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2.

Un polynucléotide de séquence complémentaire aux polynucléotides de séquences SEQ ID N°1 ou SEQ ID N°2 constitue également un objet de l'invention.

Font également partie de l'invention des acides nucléiques comprenant tout ou partie d'un polynucléotide possédant au moins 60%, 65%, 70%, 75%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% ou encore 99,8% d'identité en nucléotides avec la séquence nucléotidique de l'un quelconque des acides nucléiques dont les séquences sont définies dans la présente description, ou un acide nucléique de séquence complémentaire.

Le terme « isolé » au sens de la présente invention désigne un matériel biologique qui a été soustrait à son environnement originel (l'environnement dans lequel il est localisé naturellement).

Par exemple, un polynucléotide présent à l'état naturel dans une plante ou un animal n'est pas isolé.

Le même polynucléotide séparé des acides nucléiques adjacents au sein desquels il est naturellement inséré dans le génome de la plante ou de l'animal est isolé.

Un tel polynucléotide peut être inclus dans un vecteur et/ou un tel polynucléotide peut être inclus dans une composition et demeurer néanmoins à l'état isolé du fait que le vecteur ou la composition ne constitue pas son environnement naturel.

Le terme « purifié » ne nécessite pas que le matériel soit présent sous une forme de pureté absolue, exclusif de la présence d'autres composés. Il s'agit plutôt d'une définition relative.

Un polynucléotide est à l'état purifié après purification du matériel de départ ou du matériel naturel d'au moins un ordre de grandeur, de préférence deux ou trois et préférentiellement quatre ou cinq ordres de grandeur.

Aux fins de la présente description, l'expression « séquence nucléotique » peut être employée pour désigner indifféremment un polynucléotide ou un acide nucléique. L'expression « séquence nucléotidique » englobe le matériel génétique lui-même et n'est donc pas restreinte à l'information concernant sa séquence.

L'invention est également relative à un acide nucléique codant pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 de *Clostridium butyricum*.

Préférentiellement, un tel acide nucléique est caractérisé en ce qu'il comprend un premier polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°1 et un second

polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°2.

Selon un mode de réalisation particulier, un tel acide nucléique codant pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 comprendra en outre une séquence à fonction de promoteur, fonctionnelle dans la cellule hôte dans laquelle l'expression des polynucléotides codant pour les deux sous-unités de cette enzyme est recherchée.

Une telle séquence nucléotidique promotrice de la transcription peut être la séquence promotrice SEQ ID N°3 ou une séquence ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec cette dernière.

L'invention a également pour objet un acide nucléique à fonction de promoteur bactérien, notamment chez *Clostridium butyricum*, comprenant un polynucléotide ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence SEQ ID N°3, ou un polynucléotide de séquence complémentaire.

Comme déjà mentionné plus haut, une organisation en opéron unique permet, chez la bactérie *Clostridium butyricum*, la synthèse d'un produit de transcription (ARN messager) comprenant à la fois les séquences codant pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12, qui catalyse la transformation du glycérol en 3-hydroxypropionaldéhyde (3-HPA) et la 1,3-propanediol déshydrogénase (DHAT) qui catalyse la transformation du 3-HPA en 1,3-propanediol.

L'invention concerne donc également un acide nucléique comprenant tout ou partie d'un polynucléotide codant une 1,3-propanediol déshydrogénase ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°4, ou un polynucléotide séquence complémentaire.

Dans un mode de réalisation particulier d'un acide nucléique purifié ou isolé selon l'invention, il peut être avantageux de pouvoir inclure dans une même séquence les acides nucléiques codant respectivement pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydrogénase et pour la 1,3-propanediol déshydrogénase, un tel acide nucléique codant alors pour les deux enzymes susceptibles de catalyser la totalité des étapes de bioconversion du glycérol en 1,3-propanediol.

En conséquence, l'invention est également relative à un acide nucléique comprenant, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3':

a) un premier acide nucléique caractérisé en ce qu'il comprend un premier polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°1 et un second polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°2;

b) un second acide nucléique comprenant un polynucléotide codant une 1,3-propanediol déshydrogénase ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°4 .

Les séquences nucléotidiques codant respectivement pour la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase de l'acide nucléique ci-dessus décrit, pourront en outre être avantageusement placées sous le contrôle d'une séquence promotrice appropriée, telle que la séquence SEQ ID N°3 ou de toute autre séquence promotrice fonctionnelle dans la cellule hôte dans laquelle leur expression est recherchée.

Un acide nucléique répondant à la définition ci-dessus est par exemple le polynucléotide de séquence SEQ ID N°5 ou encore un polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°5.

L'acide nucléique de séquence SEQ ID N°5 comprend les éléments fonctionnels caractéristiques suivants:

a) un terminateur de transcription d'une région codante localisée en amont de l'opéron 1,3-propanediol dans le génome de *Clostridium butyricum*.

Ce motif terminateur de transcription possède une structure en épingle à cheveux centré sur le nucléotide en position 27 de la séquence SEQ ID N°5 ($\Delta G = -25,2$ kcal/mol) qui comprend une tige 19 pb, les deux brins de la tige étant constitués respectivement des nucléotides en positions 5 à 23 et des nucléotides en positions 30 à 48 de la séquence SEQ ID N°5, la boucle de la structure en épingle à cheveux étant constituée par les nucléotides en positions 24 à 29 de la séquence SEQ ID N°5.

Ce motif terminateur de transcription est suivi de la séquence ATTTT.

b) Promoteur de l'opéron 1,3-propanediol.

Le promoteur de l'opéron 1,3-propanediol est localisé du nucléotide en position 100 au nucléotide en position 200 de la séquence SEQ ID N°5.

5 Ce promoteur comprend une boîte (-35) de séquence TAGATA localisée du nucléotide en position 142 au nucléotide en position 147 de la séquence SEQ ID N°5. Ce promoteur comprend également une boîte (-10) de séquence TATTAT localisée du nucléotide en position 164 au nucléotide en position 169 de la séquence SEQ ID N°5, la distance entre les boîtes -35 et les boîtes -10 étant de 16 pb.

c) *orf11* (séquence codant pour la première sous-unité de la glycérol déshydrogénase.

10 Il s'agit d'une phase de lecture ouverte unique de 2.361 pb codant pour le polypeptide ORF11 de 787 acides aminés de séquence SEQ ID N°6.

Le codon d'initiation ATG est localisé du nucléotide en position 313 au nucléotide en position 315 de la séquence SEQ ID N°5. Le cadre ouvert de lecture se termine par un codon stop de séquence TAA localisée du nucléotide en position 2674 au nucléotide en position 2676 de la séquence SEQ ID N°5.

15 En outre, un site de fixation au ribosome de séquence GAGGAG précède le codon d'initiation et est localisé du nucléotide en position 302 au nucléotide en position 307 de la séquence SEQ ID N°5.

20 d) *orf12* (séquence codant pour la seconde sous-unité de la glycérol déshydrogénase). Il s'agit d'un cadre de lecture ouvert unique de 912 pb codant pour un polypeptide de 304 acides aminés de séquence SEQ ID N°7. Le codon d'initiation de séquence ATG est localisé du nucléotide en position 2704 au nucléotide en position 2706 de la séquence SEQ ID N°5. Le cadre de lecture ouvert s'achève par un codon stop de séquence TAA localisée entre les nucléotides en position 3616 et le nucléotide en position 3618 de la séquence SEQ ID N°5.

30 En outre, un site de fixation du ribosome de séquence AAGGGGA précède le codon d'initiation et est localisé du nucléotide en position 2689 au nucléotide en position 2695 de la séquence SEQ ID N°5.

e) *dhat* (séquence codant pour la 1,3-propanediol déshydrogénase) .

35 Il s'agit d'une phase de lecture ouverte unique de 1155 pb codant pour un polypeptide de 385 acides aminés de séquence SEQ ID N°8.

Le codon d'initiation de séquence ATG est localisé du nucléotide en position 3678 au nucléotide en position 3680 de la séquence SEQ ID N°5

La phase de lecture ouverte se termine par un codon stop de séquence TAA localisé du nucléotide en position 4833 au nucléotide en position 4835 de la séquence SEQ ID N°5.

En outre, un site de fixation du ribosome de séquence AGGAGA précède le codon d'initiation et est localisé du nucléotide en position 3663 au nucléotide en position 3668 de la séquence SEQ ID N°5.

10 f) Termineur de transcription de l'opéron 1,3-propanediol.

Le termineur de transcription de l'opéron 1,3-propanediol possède une structure en épingle à cheveux centrée sur le nucléotide en position 4933 de la séquence SEQ ID N°5 ($\Delta G = -27,4$ kcal/mol) et comprend une tige de 22 pb constituée respectivement des nucléotides localisés en positions 4909 à 4930 de la séquence SEQ ID N°5 et des nucléotides localisés de la position 4936 à 4957 de la séquence SEQ ID N°5.

La boucle de l'épingle à cheveux est constituée de la séquence allant du nucléotide en position 4931 au nucléotide en position 4935 de la séquence SEQ ID N°5.

La structure en épingle à cheveux est suivie de la séquence TATTTTAATT.

Chacune des séquences fonctionnelles comprise dans l'opéron 1,3-propanediol de séquence SEQ ID N°5, tel que décrit ci-dessus, peut être mise en oeuvre individuellement, par exemple par insertion dans un vecteur de clonage et/ou d'expression, qu'il s'agisse de l'une des régions codant pour un polypeptide de l'invention ou encore d'une région régulatrice (promoteur ou termineur de transcription).

De telles séquences nucléotidiques d'intérêt peuvent être obtenues selon des techniques bien connues de l'homme du métier telles que l'utilisation d'enzymes de restriction, dont l'utilisation est décrite en détail dans l'ouvrage de **SAMBROOK et al. (1989)** ou encore par amplification sélective de la séquence cible d'intérêt, par exemple par PCR.

Font également partie de l'invention les acides nucléiques hybridant, dans des conditions d'hybridation de forte stringence, avec un acide nucléique choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

Par « conditions d'hybridation de forte stringence » au sens de la présente invention, on entend les conditions d'hybridation suivantes:

- préhybridation des filtres pendant 8 heures à 65°C dans un tampon composé de 6 x SSC, 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 0,02% PVP, 0,02% FICOLL, 0,02% SAB et 500 µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé;

- hybridation des filtres pendant 48 heures à 65°C en présence de tampon 1 x SSC correspondant à 0,15 M de NaCl et 0,05 M de citrate de sodium;

- trois lavages des filtres dans une solution contenant un tampon 2 x SSC et 0,1% SDS à 68°C pendant 15'.

Les conditions de forte stringence définies ci-dessus sont adaptées à l'hybridation d'une molécule d'acide nucléique d'une longueur de 20 nucléotides.

Il va sans dire que ces conditions d'hybridation doivent être adaptées en fonction de la longueur de l'acide nucléique dont l'hybridation est recherchée, selon des techniques bien connues de l'homme du métier.

Les conditions convenables d'hybridation peuvent par exemple être adaptées selon l'enseignement contenu dans l'ouvrage de **HAMES & HIGGINS** (1985) ou encore dans l'ouvrage de **SAMBROOK et al**; (1989).

Font également partie de l'invention les acides nucléiques comprenant au moins 20 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

De tels acides nucléiques comprennent avantageusement 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 150, 200 à 250, 300, 400, 500 nucléotides consécutifs d'un polynucléotide choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

De tels acides nucléiques peuvent comprendre par exemple 20, 25, 30, 35, 40, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 400 ou 500 nucléotides consécutifs d'un

polynucléotide choisi parmi les séquences nucléotidiques SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5.

De tels acides nucléiques peuvent être notamment utiles en tant que sondes ou amorces nucléotidiques afin de détecter la présence de l'une
5 quelconque des séquences nucléotidiques de SEQ ID N°1 à SEQ ID N°5 dans un échantillon.

De telles sondes ou amorces nucléotidiques peuvent être notamment utiles afin de mesurer l'expression de l'un quelconque des produits de transcription des régions codantes *orf11*, *orf12* ou *dhat* selon des techniques bien
10 connues de l'homme du métier.

Afin d'améliorer encore la capacité des hôtes cellulaires transformés avec un acide nucléique selon l'invention à produire le 1,3 propanediol à partir de glucose, un tel hôte cellulaire recombinant pourra en outre être transformé avec un ou plusieurs gènes codant pour une ou plusieurs enzymes aptes à catalyser la
15 transformation du glucose en glycérol.

Un couple d'enzymes capable d'effectuer la transformation du glucose en glycérol est par exemple une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et une glycérol-3-phosphatase.

Ainsi, un acide nucléique selon l'invention pourra comprendre, outre les
20 séquences codant respectivement pour la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 et la 1,3-propanediol déshydrogénase (*dhaT*), un troisième acide nucléique codant pour une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et un quatrième acide nucléique codant pour une glycérol-3-phosphatase.

Pourront être employés en particulier un acide nucléique codant pour la
25 *gpd1* glycérol-3-phosphate déshydrogénase et un quatrième acide nucléique codant pour la *gpp2* glycérol-3-phosphatase.

La *gpd1* est par exemple décrite par **LARSSON et al.** (1993). Mol. Microbiol., 10, 1101-1111.

30 La *gpd2* est par exemple décrite par **HIRAYAMA et al.** (1995). Mol. Gen. Genet., 249, 127-138.

Selon encore un autre aspect, l'invention concerne un vecteur recombinant de clonage et/ou d'expression comprenant un acide nucléique

codant pour une glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 ou une 1,3-propanediol déshydrogénase selon l'invention.

Un tel vecteur recombinant comprendra avantageusement une séquence promotrice, constitutive ou inductible, capable de diriger l'expression de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 et/ou de la 1,3-propanediol déshydrogénase et un terminateur de transcription Rho-indépendant.

Il peut s'agir par exemple d'un vecteur navette capable de se répliquer dans différents hôtes cellulaires.

Un premier vecteur recombinant préféré selon l'invention est le plasmide pSPD5 contenu dans la souche de *Escherichia coli* déposée à la Collection National de Cultures de Microorganismes (CNCM) le 24 Juin 1999 sous le n° d'accès I-2243.

D'autres vecteurs préférés selon l'invention sont par exemple les suivants:

15

- les vecteurs pTPG(-) et pOPG représentés aux figures 3 et 4.

- Les vecteurs pSGD et pPPF2 représentés aux figures 5 et 6;

20

- des vecteurs possédant le réplicon du pCB101, tel que le vecteur pCTC511 (WILLIAMS et al., 1990) ou encore le vecteur pSYSL2 (LEE et al., 1992),

25

- un vecteur navette portant le réplicon pAM β 1 d'*Enterococcus faecalis* DS-5, tel que le vecteur pCTC41 (WILLIAMS et al., 1990);

- les vecteurs navettes *E.coli* *B. Subtilis*/*C. acetobutylicum* désignés pKNT11 et pKNT14 (TRUFFAUT et al., 1989);

30

L'invention concerne également une cellule hôte recombinante comprenant un acide nucléique ou un vecteur recombinant selon l'invention.

Une telle cellule hôte recombinante comprend avantageusement un acide nucléique codant pour la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 ou encore un vecteur contenant un tel acide nucléique.

De préférence, une telle cellule hôte recombinante comprendra un acide nucléique codant à la fois pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 ainsi que pour la DHAT.

Il peut s'agir indifféremment d'une bactérie, d'un champignon ou d'une
5 levure.

Une cellule hôte recombinante bactérienne sera choisie préférentiellement parmi *Escherichia coli*, *Clostridium* ou encore *Bacillus*, *lactobacillus* et *lactococcus*.

Une cellule de levure recombinante selon l'invention sera
10 préférentiellement de la souche *Saccharomyces cerevisiae*.

Une cellule hôte recombinante préférée selon l'invention est la souche de *Escherichia coli* déposée à la Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) le 24 Juin 1999 sous le n° d'accès I-2243.

L'invention a également pour objet les polypeptides constituant
15 respectivement l'une et l'autre des deux sous-unités protéiques constitutives de la glycérol déshydratase dimérique indépendante du coenzyme B12 selon l'invention.

De préférence, un polypeptide selon l'invention se présente sous une forme isolée ou purifiée.

20 L'invention se rapporte également à un polypeptide constituant l'enzyme 1,3-propanediol déshydrogénase de *Clostridium butyricum*.

Plus particulièrement, l'invention a trait à un polypeptide comprenant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID N°6 ou SEQ ID N°7.

25 L'invention concerne également une protéine dimérique composé d'un premier polypeptide ayant au moins 50% d'identité en aminoacides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°6 et d'un second polypeptide ayant au moins 50% d'identité en aminoacides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°7.

De manière tout à fait préférée, un tel polypeptide présente une activité
30 catalytique glycérol déshydratase ne nécessitant pas la présence du coenzyme B12, une telle activité catalytique pouvant être mesurée conformément aux exemples.

Un autre objet de l'invention consiste en un polypeptide comprenant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés ayant au moins 80% d'identité en
35 acides aminés avec la séquence SEQ ID N°8.

De manière tout à fait préférée, un tel polypeptide présente une activité catalytique de 1,3-propanediol-déshydrogénase.

L'invention est également relative à un procédé de production d'un polypeptide selon l'invention, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) préparation d'un vecteur d'expression recombinant selon l'invention;
- b) introduction du vecteur d'expression recombinant de l'étape a) dans une cellule hôte appropriée;
- c) culture de la cellule hôte recombinante de l'étape b) dans un milieu de culture approprié;
- d) récupération du polypeptide recombinant produit dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire;
- e) le cas échéant, purification du polypeptide récupéré.

Les polypeptides selon l'invention peuvent être purifiés par exemple par passage sur une colonne de chromatographie d'affinité à ions nickel ou cuivre.

Ces polypeptides peuvent en outre être caractérisés par leur activité enzymatique glycérol déshydratase ou 1,3-propanediol déshydrogénase, comme indiqué dans les exemples.

Les polypeptides selon l'invention peuvent aussi être purifiés par exemple par chromatographie liquide à haute performance tels que des chromatographies HPLC en phase inverse et/ou d'échange cationique.

Font également partie de l'invention les polypeptides comprenant des modifications d'acides aminés allant de 1, 2, 3, 4, 5, 10 à 20 substitutions, additions ou délétions d'un acide aminé par rapport à la séquence de l'une ou l'autre des deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 ou de la 1,3-propanediol déshydrogénase.

De manière tout à fait préférée, les modifications d'acides aminés dans un polypeptide de l'invention, par rapport aux polypeptides de référence, n'induiront pas de changement important de leur activité biologique. Ainsi, les modifications dans la séquence d'acides aminés des sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 selon l'invention seront tels que l'activité catalytique sera au moins égale à 50% de l'activité catalytique initiale et sera de préférence améliorée par rapport à l'activité catalytique initiale.

Il en est de même pour les modifications d'acides aminés dans la séquence protéique de la 1,3-propanediol déshydrogénase selon l'invention.

L'un quelconque des polypeptides selon l'invention ou encore un fragment peptidique de celui-ci peuvent être utilisés pour la préparation
5 d'anticorps dirigés spécifiquement contre ce dernier.

Constitue également un objet de l'invention un polypeptide comprenant au moins 20 acides aminés consécutifs d'une séquence d'acides aminés choisie parmi les séquences SEQ ID N°6 à SEQ ID N°8.

Avantageusement, un tel polypeptide comprendra de 20, 25, 30, 35, 40,
10 45, 50, 75 à 100, 125, 150 ou 200 acides aminés consécutifs d'un polypeptide choisi parmi les séquences SEQ ID N°6 à SEQ ID N°8.

Préférentiellement, un tel polypeptide comprendra 20, 25, 30, 35, 40, 45,
15 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250 ou 300 acides aminés consécutifs d'un polypeptide choisi parmi les séquences d'acides aminés SEQ ID N°6 à SEQ ID N°8.

De tels anticorps spécifiques peuvent être utilisés dans des tests d'immunodétection permettant de déterminer la présence d'une glycéról déshydratase indépendante du coenzyme B12 ou d'une 1,3-propanediol déshydrogénase dans un échantillon.

20 Un tel test d'immunodétection représente une alternative à la détermination de l'activité glycéról déshydratase ou 1,3-propanediol déshydrogénase dans un échantillon suspecté de contenir ces enzymes.

Par « anticorps » au sens de l'invention, on entendra les anticorps polyclonaux mais aussi des anticorps monoclonaux tels que préparés à partir
25 d'hybridomes selon la technique décrite par **KOHLER & MILSTEIN** (1975).

Constituent également des anticorps au sens de la présente invention, des fragments d'anticorps (Fab', F(ab')₂ ainsi que des fragments d'anticorps simple chaîne Fv (brevet US N°4,946,778; **MARTINEAU et al.**, (1998)) ou encore des anticorps humanisés (**REINMANN et al.**, 1997; **LEGER et al.** 1997).

30 L'invention sera en outre illustrée, sans pour autant être limitée, par les figures et les exemples suivants.

La figure 1 représente un schéma de la voie métabolique de bioconversion du glycéról en 1,3-propanediol chez la bactérie *Clostridium*
35 *butyricum*.

La figure 2 illustre la construction du vecteur pSPD5 .

La figure 3 illustre la construction du vecteur pTPG (-).

La figure 4 illustre la construction du vecteur pOPG.

La figure 5 illustre la construction du vecteur pSGD.

5 La figure 6 illustre la construction du vecteur pPPD2.

La figure 7 illustre la production de 1,3-propanediol à partir du glycérol par la souche de *Clostridium acetobutylicum* DG1 (pSPD5).

10 La figure 8 illustre la production de 1,3-propanediol à partir du glycérol par la souche de *E. coli* DH5 α transformée par le vecteur pSPD5 et cultivée en anaérobiose.

La figure 9 illustre la production de 1,3-propanediol à partir du glycérol par la souche non recombinée de *Clostridium butyricum* VPI 1718.

La figure 10 illustre la production de 1,3-propanediol à partir de glucose par la souche de *C-acetobutylicum* DG1 [pSPD5].

MATERIELS ET METHODES.

I. CULTURE DES SOUCHES

5 1. Souche utilisée

La souche de *Clostridium butyricum* à partir de laquelle ont été isolées et caractérisées les différentes séquences d'acides nucléiques selon l'invention est la souche VPI 1718.

10 La souche de *Clostridium acetobutylicum* utilisée pour la transformation avec les différents vecteurs décrits dans les exemples est la souche disponible à l'American Type Culture Collection sous le n°ATCC 824.

La souche de *Escherichia coli* DH5 α utilisée pour la transfection avec les différents plasmides décrits dans les exemples est la souche disponible à LIFE
15 TECHNOLOGIES Inc.

2. Les plasmides.

20 Le plasmide pUC18, d'une taille de 2,7kb est décrit par **YANNISCH-PERRON et al.** (1985).

Le plasmide pIMPI, d'une taille de 4,9 kb est décrit par **MERMELSTEIN** (1992).

Le plasmide pSOS95, d'une taille de 7 kb est décrit par **SOUCAILLE et PAPOUTSAKIS** (1996).

25

3. Milieux et conditions de culture

Pour la culture de la souche d'*Escherichia coli*, le milieu LB (décrit dans **SAMBROOK et al.**, 1989) est supplémenté avec des antibiotiques (ampicilline à
30 100 $\mu\text{g/ml}$, érythromycine à 300 $\mu\text{g/ml}$, chloramphénicol à 35 $\mu\text{g/ml}$).

Les cultures des souches *Clostridium*, en particulier des souches de *Clostridium butyricum* ou des souches de *Clostridium acetobutylicum* DGI transformées par le vecteur pSPD5 ont été réalisées dans le milieu suivant, dont la composition est donnée pour 1 litre de milieu de culture:

35

	extrait de levure	4g
	glycérol	60g
	KH ₂ PO ₄	0,5g
	K ₂ HPO ₄	0,5g
5	MgSO ₄	0,2g
	NH ₄ Cl	1,5g
	FeSO ₄	10 mg
	biotine	0,04 mg
	acide paraaminobenzoïque	8 mg

10 Le pH est ajusté à 6 par addition d'ammonium et la température de croissance est de 37°C.

La clarithromycine est ajoutée à une concentration de 40 mg/l pour la culture de la souche *C. acetobutylicum* D61 (pSPP5).

15 II. TECHNIQUES ANALYTIQUES.

1. Dosage des substrats et des produits.

20 L'ensemble des substrats (glucose et glycérol) et des produits (acétate, butyrate, lactate, 1,3-propanediol) sont dosés par chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

25 L'appareil CLHP (pompe modèle 5810, Waters) est muni d'un passeur automatique (SP 8775, Spectra Physic.) possédant une boucle d'injection de 20 µl, d'un intégrateur (Intersmat ICR 1B, Shimadzu) et d'un réfractomètre (HP 1047A) .

La séparation est obtenue par passage sur une colonne à exclusion d'ions (Aminex R HPX-87H, 300 mm x 7,8 mm, Biorad) équipée d'une précolonne (Micro-Guard, Biorad) garnie de la même résine ionique H⁺.

30 La phase mobile est constituée par de l'acide sulfurique à 0,031 mM, le flux est de 0,7 ml par minute et la séparation est réalisée à température ambiante.

2. Dosage des activités.

a) Dosage de la 1,3-propanediol déshydrogénase.

Le dosage de la 1,3-propanediol déshydrogénase a été réalisé dans un volume de 1 ml du milieu réactionnel suivant:

1,3-propanediol	100 mM
NAD ⁺	2mM
DTT	2 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	30 mM
K ₂ CO ₃	100 mM

extrait cellulaire: essais sur 5 µl, 10 µl, 50 µl

H₂O complété à 1 ml

La réduction du NAD⁺ est suivie par la mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 340 nanomètres.

Le coefficient d'extinction $\epsilon(\text{NADH})$ est de $6,22 \text{ mM}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

b) Dosage de la glycérol déshydratase

Le dosage de la glycérol déshydratase est réalisé sur un extrait cellulaire préalablement passé sur une colonne de désalage. Ce dosage est réalisé dans un volume 1 ml du milieu réactionnel suivant:

KCl	0,05 M
1,2-propanediol	0,06 M
tampon KPO ₄ pH7	0,035 M
extrait cellulaire	essai sur 5 µl, 10 µl, 20 µl, 30 µl.
H ₂ O complété à	1 ml

La réaction est arrêtée après 10 minutes à 37 °C à l'aide de 1 ml de tampon citrate à 100 mM pH 3,6 et 500 µl de MBTH à 0,1%.

Après 15 minutes à 37°C, 1 ml d'eau est ajouté et le taux de propionaldéhyde formé est déterminé par mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 305 nanomètres.

Le coefficient d'extinction molaire pour le produit formé est de $13,3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$.

c) Mesure de la biomasse

La croissance bactérienne est suivie par la mesure, dans des fractions aliquotes prélevées à des temps déterminés, de la densité optique à la longueur d'onde de 620 nanomètres pour un trajet optique de 1 cm. Il est considéré qu'une unité de densité optique correspond à environ 3×10^8 bactéries/ml.

III. Transformation des bactéries avec les vecteurs recombinants selon l'invention.

III.1. Transformation d'*E. coli* DH5 α

La souche d'*E. coli* DH5a est rendue compétente selon le protocole établi par **INOUE et al.** (1990). Ce protocole permet d'obtenir des efficacités de transformation de l'ordre de 10^8 à 10^9 transformants/mg de pUC18. Les cellules rendues compétentes sont ensuite conservées à -80°C . La transformation des cellules compétentes par un plasmide est réalisée par choc thermique (**SAMBROOK et al.**, 1989).

III. 2. Transformation de *C. acetobutylicum*

Le plasmide à introduire dans *C. acetobutylicum* (ATCC 824 ou DG1) doit être préalablement méthylé au niveau des sites *Cac824I* (= *BsofI*). La méthylation *in vivo* est réalisée en introduisant le plasmide à méthyler dans la souche *E. coli* ER 2275 portant le plasmide pAN1 (qui contient le gène codant pour la méthylase du phage f3T1 de *Bacillus subtilis*). La préparation d'ADN plasmidique utilisée pour transformer *C. acetobutylicum* doit être très pure, purifiée par ultracentrifugation sur gradient de chlorure de césium (**SAMBROOK et al.**, 1989) ou en utilisant la trousse Qiafilter Plasmid Midiprep (**QIAGEN**).

Les transformations sont réalisées en anaérobiose stricte selon le protocole suivant, adapté de celui de **MEMMERLSTEIN** (1992). Les efficacités sont encore très faibles, de l'ordre de 10^2 transformants par mg d'ADN.

5

A partir d'une préculture en milieu CGM (10ml) à 37°C sur une nuit,

Inoculer à 10% 50 ml de milieu 2YTG.

Arrêter la culture à DO600 de 1,0 à 1,2.

10 A partir de ce moment, l'ensemble des manipulations sont réalisées dans la hotte anaérobie et dans la glace.

Centrifuger les cellules pendant 10 min à 4000 g.

Laver le culot cellulaire dans 10 ml de tampon d'électroporation.

Centrifuger 10 min à 3000-4000 g.

Resuspendre les cellules dans 500 µl de tampon d'électroporation.

15

La suspension de cellules est mise en contact avec le plasmide (5 à 10 mg d'ADN plasmidique dissout dans 5 à 50 µl de tampon TE) préalablement introduit dans la cuvette d'électroporation (de 0,4cm d'épaisseur). Le tout est conservé dans la glace.

20 Le mélange est immédiatement soumis à une décharge électrique avec les paramètres suivants : V = 2500V, C = 25 µF, et R infinie (BioRad Gene pulser II et Gene controller II) Dans ces conditions, le temps de la décharge délivrée varie de 7 à 12 ms.

25 Les cellules sont ensuite immédiatement transférées dans 10 µl de milieu 2 YTG et mises à incuber à 37°C jusqu'à reprise du métabolisme (formation de bulles de dioxyde de carbone et d'hydrogène).

La culture est alors centrifugée et le culot cellulaire repris dans un volume minimal du même milieu. La suspension est ensuite étalée sur milieu RCA avec antibiotique.

30 Composition du tampon d'électroporation :

Saccharose	270 mM
Tampon phosphate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$), pH 7.4	3 mM

EXEMPLE 1: Construction du vecteur d'expression pSPD5.

Les amorces nucléotidiques suivantes ont été synthétisées, afin d'amplifier une séquence nucléotidique contenant à la fois *orf11*, *orf12* et *dhaT*, c'est-à-dire l'ensemble des séquences codant à la fois pour les deux sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 et de la 1,3-propanediol déshydrogénase de *Clostridium butyricum*.

L'amorce PDH3 (SEQ ID N°9) inclut le site BamHI, le site de liaison aux ribosomes et le début de l'*orf11*.

L'amorce PDH4 (SEQ ID N°10) hybride avec le brin complémentaire et renferme le site SmaI et la fin du gène *dhaT*.

Une réaction d'amplification avec les amorces pDH3 et pDH4 a été réalisée sur l'ADN génomique de *Clostridium butyricum* aux conditions suivantes:

- température d'appariement des amorces: 55°C;
- durée d'élongation: 4 minutes;
- nombre de cycles : 15 cycles.

La réaction d'amplification a été réalisée avec la trousse Expand Long Template PCR (commercialisée par Boehringer).

Cette réaction a permis d'amplifier un fragment de la taille attendue de 4,6 kb.

Ce fragment amplifié a été purifié sur gel d'agarose puis digéré par les enzymes BamHI et SmaI.

En parallèle, le fragment BamHI-EheI de 4970 pb du vecteur navette *E.coli/ C. acetobutylicum* pSOS95 a été purifié sur gel d'agarose puis ligaturé avec le produit PCR de 4,6 kb. Le vecteur recombinant ainsi construit, appelé pSPD5 (figure 2), permet l'expression constitutive des gènes *orf11*, *orf12* et *dhaT* sous le contrôle du promoteur du gène de la thiolase de *C. acetobutylicum*.

EXEMPLE 2: Construction des vecteurs d'expression pTPG(-) et pOPG

Les vecteurs pTPG(-) et pOPG sont des vecteurs dérivés du vecteur navette *E. coli-Clostridium* pTLH1 (**HARRIS et al.**, 1999) qui permettent à une cellule hôte adéquate de réaliser la conversion directe du glucose en 1,3-propanediol. Essentiellement, ils permettent l'expression des gènes *orf11*, *orf12* et *dhaT* de *C. butyricum* (opéron 1,3-propanediol) ainsi que celle des gènes *GPD1* et *GPD2* de *S. cerevisiae* codant respectivement pour la glycérol-3-phosphate déshydrogénase et la glycérol-3-phosphatase (opéron artificiel *gly*, porté par le plasmide pS2 (**GELIS et al.**, 1999), dérivé du plasmide pSOS95, qui permet chez *E. coli* et *C. acetobutylicum* la conversion du glucose en glycérol). Ces deux plasmides se différencient par l'organisation de ces gènes, en deux opérons (1,3-propanediol et *gly*) dans pTPG(-), et sur un même opéron dans pOPG.

2.1. Construction de pTPG(-)

Dans un premier temps, le fragment *Sall* de 4,9 kpb du plasmide pSPD5 contenant la totalité de l'opéron 1,3-propanediol a été purifié sur gel d'agarose puis ligaturé au vecteur-navette pTLH1 digéré par *Sall*, pour obtenir le plasmide pTLP de 10,6 kpb.

En parallèle, les amorces nucléotidiques OPGLY-D et OPGLY-R ont été synthétisées afin d'amplifier la totalité de l'opéron artificiel *gly*.

L'amorce OPGLY-D inclut le site *SmaI* ainsi que le début de l'opéron artificiel *gly*. Sa séquence est la suivante :

5'-GTTACCCGGGGCTCCTGCAGCTCGACTTTTAAAC-3'

L'amorce OPGLY-R hybride avec le brin complémentaire et inclut le site *SmaI* ainsi que la fin de l'opéron artificiel *gly*. Sa séquence est la suivante :

5'-TTTCACCCGGGAACAGCTATGACCATGATTACG-3'

Une réaction d'amplification avec les amorces OPGLY-D et OPGLY-R a été réalisée sur le plasmide pS2, aux conditions suivantes :

-température d'appariement des amorces : 48°C

-durée d'élongation : 3, 5 min

5 -nombre de cycles : 10

La réaction a permis d'amplifier un fragment de la taille attendue de 2.2 kpb.

Ce fragment amplifié a été purifié sur gel d'agarose et digéré par l'enzyme *Sma*I, puis ligaturé au plasmide pTLP linéarisé par *Sma*I pour fournir le plasmide pTPG(-) de 12,8 kpb (Figure 3).

2.2. Construction de pOPG

Dans un premier temps, le fragment *Pvu*II-*Pst*I de 2,2 kpb du plasmide pS2 contenant la totalité de l'opéron glycérol a été purifié sur gel d'agarose puis ligaturé au fragment *Sma*I-*Pst*I de 5,7 kpb du vecteur-navette pTLH1, pour obtenir le plasmide pTLG1 de 7,9 kpb.

En parallèle, les amorces nucléotidiques dhaT-F et dhaT-R ont été synthétisées afin d'amplifier l'extrémité 5' du gène *dhaT*.

20 L'amorce DHAT-F inclut le site *Bam*HI ainsi que la région centrale du gène *dhaT*. Sa séquence est la suivante :

5'-TTGGATCCAGTATCTATAAATGATCCAATGC -3'

25 L'amorce DHAT-R hybride avec le brin complémentaire et inclut le site *Bgl*II ainsi que la fin du gène *dhaT*. Sa séquence est la suivante :

5'-TTAGATCTTTTAAATAGTATTAATTAATAAGCAGCC -3'

30 Une réaction d'amplification avec les amorces dhaT-F et dhaT-R a été réalisée sur le plasmide pSPD5, aux conditions suivantes :

-température d'appariement des amorces : 48°C

-durée d'élongation : 1 min

-nombre de cycles : 10

35 La réaction a permis d'amplifier un fragment de la taille attendue de 0,65 kpb.

Ce fragment amplifié a été purifié sur gel d'agarose et digéré par les enzymes *Bam*HI et *Bgl*II, puis ligaturé au plasmide pTLG1 linéarisé par *Bam*HI pour fournir le plasmide pTPG de 8,55 kpb.

Dans un dernier temps, le fragment *Bam*HI-*Sbf*I de 4,0 kpb du plasmide pSPD5 a été purifié sur gel d'agarose puis ligaturé au fragment *Bam*HI-*Sbf*I de 8,55 kpb du plasmide pTPG pour obtenir le plasmide pOPG de 12,55 kpb (Figure 4).

EXEMPLE 3: Construction du vecteur d'expression pSGD

10

Le vecteur pSGD est dérivé du plasmide pSPD5 .

Essentiellement, le vecteur pSGD exprime fonctionnellement *orf11* et *orf12* (codant respectivement pour la première et la seconde sous-unités protéiques de la glycérol déshydratase) et contient une délétion dans la région codant pour DHAT (1,3-propanediol déshydrogénase).

15

Le vecteur pSPD5 a été soumis à une digestion par l'enzyme de restriction *Sbf*I et le fragment de 4082 pb purifié sur gel d'agarose.

Il a ensuite été procédé à une digestion du vecteur pSOS95 par l'enzyme de restriction *Pst*I et le fragment de 4858 pb purifié sur gel d'agarose.

20

Ces deux fragments ont ensuite été ligaturés afin d'obtenir le plasmide pSGD.

EXEMPLE 4: Construction du vecteur d'expression pPPD2

25

Le vecteur pPPD2 est un vecteur dérivé du plasmide pSPD5 capable d'exprimer le gène *dhat* (codant pour la 1,3-propanediol déshydrogénase) et dans lequel *orf11* (codant pour la première sous-unité de la glycérol déshydratase) a été complètement délété ainsi que 100 pb à l'extrémité 5' de *orf12* (codant pour la seconde sous-unité de la glycérol déshydratase)..

30

Le vecteur pSPD5 a tout d'abord été digéré simultanément par les enzymes de restriction *Bam*HI et *Mfe*I.

Le fragment *Bam*HI-*Mfe*I de 6326 pb obtenu par la double digestion à l'aide des endonucléases de restriction correspondantes a subi un traitement en présence de l'ADN polymérase T4 afin d'obtenir des extrémités franches.

Le fragment a alors subi une religation sur lui-même afin d'obtenir le plasmide pPPD2.

EXEMPLE 5: Expression de l'opéron 1,3-propanediol dans *Clostridium acetobutylicum* DG1 cultivé sur glycérol.

La souche de *Clostridium acetobutylicum* DGI transformée avec le plasmide pSPD5 comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes a été mise en culture en présence de glycérol pendant des temps déterminés et différents paramètres ont été suivis au cours de la fermentation:

- la croissance bactérienne a été suivie par mesure de la densité optique à la longueur d'onde de 620 nanomètres et est représentée sur la figure 6 par les cercles ouverts;

- la concentration de glycérol a été suivie tout au long de la fermentation et est représentée sur la figure 7 par les carrés pleins;

- la synthèse de 1,3-propanediol a été également suivie tout au long de la fermentation et est représentée par les cercles pleins;

- de même la concentration d'acétate et de butyrate a été mesurée tout au long de la fermentation et est représentée sur la figure 7 respectivement par les triangles ouverts pointe en haut ou pointe en bas.

Les résultats présentés à la figure 7 montrent qu'une quantité significative de 1,3-propanediol est synthétisée par la souche de *Clostridium acetobutylicum* DGI transformée par le plasmide pSPD5 dès les quatre premières heures de culture. Au bout de 20 heures de fermentation, il peut être observée la production de 38 g/l de 1,3-propanediol. La production de 1,3-propanediol atteint un plateau aux environs de 18 heures après le début de la fermentation, ce plateau de production étant essentiellement dû au fait que la presque totalité du glycérol initial a été consommée par la bactérie transformée.

Il est important de noter que la souche *C. acetobutylicum* DG1 transformée par le plasmide de contrôle pIMP1 ne contenant pas les régions codant pour la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase (Memmerlstein, 1992) ne se développe pas sur le milieu de culture avec du

glycérol comme seule source carbonée et donc ne produit pas de 1,3-propanediol (Tableau 1).

EXEMPLE 6: Expression de l'opéron 1,3-propanediol dans *Escherichia coli* DH5 α cultivé sur glycérol.

Une souche d'*Escherichia coli* DH5 α a été transformée avec le vecteur pSPD5, comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

La souche d'*Escherichia coli* transformée avec le plasmide pSPD5 a été mise en culture en anaérobiose sur milieu LB supplémenté en glycérol (40 g/l) et en érythromycine (300 μ g/ml), la production de 1,3-propanediol a été mesurée à des temps déterminés.

Les résultats sont rassemblés sur la figure 8.

Les résultats de la figure 8 montrent qu'une production significative de 1,3-propanediol est obtenue dès les premières heures de fermentation. Après 80 heures de fermentation, une production d'environ 4,5 g/l de 1,3-propanediol peut être observée.

La souche de contrôle *E. coli* DH5 α [pIMP1] cultivée sur le même milieu ne conduit pas à la production de 1,3-propanediol (Tableau 1).

TABLEAU 1

Production de 1,3-propanediol par des souches recombinantes cultivées à pH 6,5 en présence de glycérol dans des conditions anaérobies

	1,3-propanediol (g/l)
<i>E. coli</i> DH5 α (pIMP1)	0
<i>E. coli</i> DH5 α (pSPD5)	4,5
<i>C. acetobutylicum</i> DG1 (pIMP1)	pas de croissance
<i>C. acetobutylicum</i> DG1 (pSPD5)	38

Les résultats du tableau 1 montrent qu'une production significative de 1,3-propanediol (environ 5g/l) est obtenue avec la souche de *Escherichia coli* DH5 α transfectée par le plasmide pSPD5, alors que la souche de *E.coli* transfectée avec le plasmide témoin pIMP1 ne produit pas de quantité détectable de 1,3-propanediol.

Avec la construction pSPD5, une quantité de 1,3-propanediol environ 7,6 fois supérieure est observée avec la souche *Clostridium acetobutylicum* par rapport à la souche de *Escherichia coli* DH5 α . Ceci est due majoritairement au fait que les signaux de régulation du plasmide pSPD5 ont été optimisés pour l'expression de l'opéron 1,3-propanediol dans *Clostridium acetobutylicum*.

Des signaux de régulation, tels qu'un promoteur très actif chez *Escherichia coli* sont susceptibles de permettre l'obtention de quantité de 1,3-propanediol aussi importante chez *Escherichia coli* que celle observée chez *Clostridium acetobutylicum*.

EXEMPLE 7: Expression de l'opéron 1,3-propanediol dans *Clostridium butyricum* sauvage cultivé sur glycérol.

La souche de *Clostridium butyricum* VPI 1718 a été mise en culture en présence de glycérol et la synthèse de 1,3-propanediol a été mesurée à des temps déterminés tout au long de la fermentation.

Les résultats sont représentés à la figure 9.

Les résultats de la figure 9 montrent qu'une production de 34 g/l de 1,3-propanediol est observée au bout de 60 heures de fermentation.

Si l'on se reporte aux résultats représentés sur la figure 7, on peut observer que la production de 1,3-propanediol par la souche de *Clostridium acetobutylicum* DG1 transformée par le plasmide pSPD5 est beaucoup plus rapide (22 heures contre 60 heures) et supérieure à la production de 1,3-propanediol obtenue avec la souche de *Clostridium butyricum* exprimant naturellement la glycérol déshydratase indépendante du coenzyme B12 et la 1,3-propanediol déshydrogénase selon l'invention.

Par ailleurs, les niveaux d'activité catalytique, exprimés en unités par mg, de glycérol déshydratase et de 1,3-propanediol déshydrogénase ont été mesurés à la fois chez *Clostridium acetobutylicum* et chez *Clostridium butyricum*.

Les résultats sont représentés dans le tableau 2 DG1[pSPD5] ci-après.

TABLEAU 2
Niveaux des enzymes impliquées dans la production
de 1,3-propanediol dans les souches de *C. acetobutylicum*
recombinantes et de *C. butyricum*

	Glycérol déshydratase (U/mg)	1,3-propanediol déshydrogénase (U/mg)
<i>C.acetobutylicum</i> DG1 (PSPD5) croissance sur glycérol	3,5	2,4
<i>C.acetobutylicum</i> DG1 (pIMP1) croissance sur glucose	0,01<	0,005<
<i>C.butyricum</i> croissance sur glycérol	0,45	0,56

Les résultats présentés dans le tableau 2 indiquent que les niveaux d'activité de la glycérol déshydratase et de la 1,3-propanediol déshydrogénase exprimées dans la souche de *Clostridium acetobutylicum* transformée par le plasmide pSPD5 sont bien supérieurs (respectivement 7,8 et 4,3 fois supérieurs) aux niveaux d'activité glycérol déshydratase et 1,3-propanediol déshydrogénase exprimés par la souche de *Clostridium butyricum* produisant naturellement ces enzymes.

Comme contrôle, une souche de *Clostridium acetobutylicum* transformée avec le plasmide pIMP1 ne contenant pas les régions codant pour la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase ne produit pas de quantité détectable de ces deux enzymes, ce qui montre clairement que l'activité observée chez la souche transformée par le plasmide pSPD5 est uniquement due à l'expression de l'opéron 1,3-propanediol selon l'invention.

Les résultats présentés dans le tableau 2 démontrent clairement l'intérêt de transformer une souche de micro-organisme ne produisant pas naturellement la glycérol déshydratase et la 1,3-propanediol déshydrogénase selon l'invention avec un vecteur recombinant tel que le vecteur pSPD5 car il est possible dans ce

cas, par exemple par l'emploi de promoteurs appropriés, d'obtenir des niveaux d'expression qui ne sont jamais atteints naturellement.

Exemple 8 Expression des gènes de l'opéron 1, 3 propanediol chez *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur glycérol.

Les parties codantes des gènes *orf11*, *orf12* et *dhaT* ont été individuellement amplifiées par PCR en introduisant au niveau des amorces un site *Apal* en partie 5' et *SmaI* en partie 3'. Chaque gène a ensuite été introduit, grâce aux deux sites précédents, dans le vecteur pYGK (CROUX et SOUCAILLE, 1999) permettant de construire une cassette d'expression sous le contrôle du promoteur du gène *PGK* et du terminateur du gène *CYC1*. Les trois gènes dans leur cassette d'expression ont ensuite été sortis du vecteur par digestion *NotI*-*SacII* et introduit dans trois vecteurs centromériques de la famille pRS31X qui diffèrent par la nature de leur marqueur de sélection (*his3*, *trp1*, *ura3*). Chacun des trois plasmides a ensuite été introduit dans la souche de *S. cerevisiae* YPH500 (*ura3 lys2 ade2 trp1 his3 leu2*) et sélectionné par complémententation de trois des auxotrophies de cette souche.

CROUX et SOUCAILLE, 1999, Non publié.

EXEMPLE 9 : Expression de l'opéron 1,3-propanediol dans *Clostridium acetobutylicum* DG1 [pSPD5] cultivé sur glucose

La souche *Clostridium acetobutylicum* DG1 transformée par le plasmide pSPD5 comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes a été cultivée en présence de glucose comme seule source carbonée et différents paramètres ont été suivis au cours de la fermentation.

Les résultats sont représentés sur la figure 10.

Les résultats de la figure 10 montrent une synthèse, quoique faible (0,3 g/l) de 1,3-propanediol, alors que la totalité du glucose a été consommée. Cette production, due à la présence d'une faible concentration en glycérol intracellulaire chez *Clostridium acetobutylicum* DG1 [pSPD5] démontre toutefois la faisabilité d'un procédé de conversion directe du glucose en 1,3-propanediol dans une souche portant les gènes revendiqués par la présente invention.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES:

- **Gelis, C. et al.**, 1999 - Non publié.
- **Hames BD and Higgins SJ**, 1985, "Nucleic acid hybridization : a practical approach", Hames and Higgins Ed., IRL Press, Oxford.
- 5 • **Harris, L.M. et al.**, 1999 - Non publié.
- **Houbenweyl**, 1974, in Methode der Organischen Chemie, E. Wunsch Ed., Volume 15-I et 15-II,
- **Inoue et al.**, 1990, Gene, 96, 23-28.
- **Kohler G. and Milstein C.**, 1975, Nature, **256** : 495.
- 10 • **Lee S.Y. et al.**, 1992, Biotech Lett., **14** : 427-432.
- **Leger OJ, et al.**, 1997, Hum Antibodies, **8**(1): 3-16
- **Maguin E. et al.**, 1992, J. Bacteriol., **174** : 5633-5638.
- **Martineau P, Jones P, Winter G**, 1998, J Mol Biol, **280**(1):117-127
- **Memmerlstein D.L.**, 1992, PhD Thesis, Northwestern University, Evanston, 15 Illinois, USA.
- **Merrifield RB**, 1965a, Nature, **207**(996): 522-523.
- **Merrifield RB.**, 1965b, Science, **150**(693): 178-185.
- **Reimann KA, et al.**, 1997, AIDS Res Hum Retroviruses. **13**(11): 933-943
- **Sambrook, J. Fritsch, E. F., and T. Maniatis.** 1989. Molecular cloning: a 20 laboratory manual. 2ed.
- **Soucaille P. et Papoutsakis**, 1996, Non Publié.
- **Truffaut N. et al.**, 1989, FEMS Microbiol. Lett., **58** : 15-20.
- **Williams D.R. et al.**, 1990, J. Gen. Microbiol., **136** : 819-826
- **Yannish-Perron C. et al.**, 1985, Gene, **33** : 103-119.

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE (INRA)

5

<120> Procédé de préparation du 1,3-propanediol à partir d'un
microorganisme recombinant , en l'absence de coenzyme
B12 ou de l'un de ses précurseurs.

10 <130> 1,3-propanediol INRA

<140>

<141>

15 <160> 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

20 <211> 2364

<212> ADN

<213> Clostridium butyricum

<400> 1

25 atgataagta aaggatttag tacccaaaca gaaagaataa atattttaaa ggctcaaata 60
ttaaagtcta aaccatgtgt tgaatcagaa agagcaatat taataacaga atcattttaa 120
caaacagaag gccagccagc aattttaaga agagcattgg cattgaaaca cataactgaa 180
aatatcccta taacaattag agatcaagaa cttatagtgg gaagtttaac taaagaacca 240
aggtcttcac aagtatttcc tgagttttct aataagtggt tacaagatga attggataga 300
30 ttaaataaga gaactggaga tgcattccaa atttcagaag aaagtaaaga aaaattaaaa 360
gatgtctttg agtattggaa tggaaagaca acaagtgagt tagcaacttc atatatgaca 420
gaggaaacaa gagaggcagt aaattgtgaa gtatttactg taggaaacta ctattataat 480
ggcgtaggac atgtatctgt agattatgga aaagtattaa gggttggatt taatgggatt 540
ataaatgagg ctaaggaaca attagaaaaa aacaggagta tagatcctga ttttataaag 600
35 aaagaaaaat tcttaaatag tgttattatc tcatgcgaag ctgcaataac atatgtaa 660

agatatgcta aaaaggctaa agagattgca gataatacaa gtgatgcaaa aagaaaagct 720
 gaattaaatg aaatagcaaa aatttggttca aaagtttcag gagagggagc taaatctttc 780
 tatgaagcat gtcaattatt ttgggtttatt catgcaataa taaatataga atctaattgga 840
 cattctattt ctccagctag atttgatcaa tacatgtatc catattatga aaatgataaa 900
 5 aatataacag ataagtttgc tcaagaatta atagattgta tctggattaa attaaatgat 960
 attaataaag taagagatga gatttcaact aaacattttg gtgggttacc aatgtatcaa 1020
 aaattaattg ttgggggtca aaattcagaa ggaaaagatg caactaataa agtatcatat 1080
 atggcattag aagcagctgt ccatgtaaag ttgcctcagc catctttgtc agtaagaata 1140
 tggaataaga ctccagatga atttttgtct agagcagcag aattaactag agaagggtta 1200
 10 ggacttcctg cttattataa tgatgaagtt attattccag cattagtttc tagagggtct 1260
 acattagaag atgcaagaga ctacggaata attggatgtg ttgaaccaca aaagccagga 1320
 aaaacagaag gatggcatga ttcagcattc tttaatcttg caagaatagt agagttaact 1380
 ataaattctg gatttgataa aaataaacag attggacctt aaactcaaaa ttttgaagaa 1440
 atgaaatcct ttgatgaatt catgaaagct tataaagctc aaatggagta ttttgtaaaa 1500
 15 catatgtgct gtgctgataa ttgcatagat attgcacatg cagaaagagc tccattacct 1560
 ttcttgtcat caatggttga taattgtatc ggaaaaggaa agagccttca agatgggtgt 1620
 gcagaatata acttcagtgg accacaaggt gttggagtag ctaatatggg agattcatta 1680
 gttgcagtta aaaaaattgt gtttgatgaa aataagatta ctcttcaga attaaagaaa 1740
 acattaaata atgattttta aaattcagaa gaaatacaag cettactaaa aaatgctcct 1800
 20 aagtttggaa atgatattga tgaagttgat aatttagcta gagaggggtgc attagtatac 1860
 tgtagagaag ttaataaata tacaaatcca aggggaggaa attttcaacc aggattatat 1920
 ccatcttcaa ttaatgtata ttttggagc ttaacaggtg ctactccaga tggaaggaaa 1980
 tccggacaac cattagctga tgggggttct ccatcaagag gctgtgatgt atctggacct 2040
 actgcagctt gtaactcagt tagtaaatta gatcatttta tagcttcaaa tggaacttta 2100
 25 tttaatcaaa aattccatcc gtcagcatta aaaggtgata atggattaat gaatttatca 2160
 tcattaataa gaagttattt tgatcaaaag ggatttcatg ttcaatttaa tgtaatagat 2220
 aaaaaaatat tacttgcagc acaaaaaaat cctgaaaaat atcaagattt aattgttaga 2280
 gttgcaggat atagtgcaca gttcatttct ttagataaat ctattcaaaa tgatattatt 2340
 gcaagaactg aacatgttat gtaa 2364

30

<210> 2

<211> 915

<212> ADN

35 <213> *Clostridium butyricum*

<400> 2

atgagtaagg agataaaagg cgttttatatt aacatacaaa aatttttcgtt acatgatggg 60
 cctggaataa gaactatagt attttttaag ggatgttcaa tgtcgtgctt atggtgcagt 120
 5 aatccagaat cccaagatat taaacctcaa gtaatgttta ataaaaattt atgtacaaaa 180
 tgtggaagat gtaaactctca atgtaaaagt gcaggatttg atatgaattc agaatatagg 240
 atagataaaa gcaaatgtac agagtgtaca aaatgtgttg ataattgctt aagcggggca 300
 cttgttattg aaggaaggaa ttacagtgtt gaagacgtta taaaggaatt gaaaaaagat 360
 agtgttcaat atagaagatc aaacggtgga attacactat ctggagggga agtattactt 420
 10 caaccagatt ttgcagtgga gcttttaaaa gagtgtaaatt catatggctg gcacactgcc 480
 attgaaacag caatgtatgt taatagtga tctgtaaaaa aagtaattcc atatatagat 540
 ctggctatga ttgatataaa aagtatgaat gatgaaatcc ataggaaatt tacaggagtg 600
 agtaacgaaa taatattaca aaacattaaa ttaagtgatg aattagctaa agaaataata 660
 atcagaattc ctgtaataga aggattttaat gcagatttac aaagtatagg agcaatagct 720
 15 caattttcaa aatcattaac aaatcttaaa agaatagatc ttcttcata ccataattat 780
 ggagaaaata agtatcaagc aattggaaga gagtattctt tgaaagaact aaaatcacct 840
 agtaaagaca aaatggaaag attaaaagct ttagttgaaa tcatgggaat accgtgcaca 900
 attggagctg agtaa 915

20

<210> 3

<211> 28

<212> ADN

<213> Clostridium butyricum

25

<400> 3

tagataaaac aaacaaaaat gttattat

28

30

<210> 4

<211> 1158

<212> ADN

<213> Clostridium butyricum

<400> 4

atgagaatgt atgattattht agtaccaagt gtaaacttht tgggagcaaa ttcagtatca 60
 gtagtaggtg aaagatgcaa aatattaggt ggaaaaaaag cattgatagt tacagataag 120
 tttctaaaag atatggaagg tggagctgtt gaattaacag ttaaataattht aaaagaagct 180
 5 ggattagatg ttgtatatta tgacggagtt gaaccaaatht caaaagatgt taatgttata 240
 gaaggattaa aatatttht aaagaataat tgtgacatga tagtaactgt aggtggagga 300
 agttcgcagtt attgctgtta gggaatagga attgctgcaa cacatgaagg agatcttht 360
 gattatgcag gaatagaaac acttgtcaat ccattgccac caatagtagc tgtaaatact 420
 actgcaggaa ctgctagtga attaactcgt catttgtgtat tgactaatac aaaaaagaaa 480
 10 ataaaattht ttatagttag ctggagaaat ttgcctctag tatctataaa tgatccaatg 540
 cttatgggtca aaaaacctgc aggattaaca gcagctacag gaatggatgc tttaacacat 600
 gcaatagaag catatgtatc aaaagatgca aatccagtaa cagatgcttc agcaatacaa 660
 gctattaaat taatttcaca aaatttaaga caagctgtag ctttaggaga aaatcttgaa 720
 gcaagagaaa atatggctta tgcattcatta ctacaggaa tggcatttht taatgctaat 780
 15 ttaggatatg tacatgcaat ggctcatcaa ttagggggac tgtatgatat ggcacatggt 840
 gttgctaatt caatgctatt accacatggt gaacgttata atatgctatc aaatcctaag 900
 aagtttgcag atatagcaga atttatggga gaaaatatat ctggacttht tgtaatggaa 960
 gcagcagaga aagccataaa tgcaatgttc aggtcttcag aggatgttgg aattccgaaa 1020
 agtctaaagg agatgggagt gaaacaagaa gattttgagc atatggcaga actagctctt 1080
 20 ttagatggaa atgccttht caatccaaga aaaggaaatg caaaagatat tataaatatt 1140
 tttaggctg cttattaa 1158

<210> 5

25 <211> 4963

<212> ADN

<213> Clostridium butyricum

<400> 5

30 gaataaaagt tatctaataa tgataaaagt cattattaga taacttht ttttaaaata 60
 actactaata aaaagttcaa agaataatc agtagacatt tgaaagaatg caatgataaa 120
 caattgtatt agttthtact ttagataaaa caaacaaaaa tgttattatt agccaagaaa 180
 atactgttac ataaaaaacg agaaaaacat agcaaaagag taccaatatt aagcaataaa 240
 gtttgttaaa atattatcaa taaaatgata agattagata aaccaagtaa gaatgtgatt 300
 35 ggaggagtaa aatgataag taaaggattt agtaccctaa cagaaagaat aatatttht 360

aaggctcaaa tattaaatgc taaaccatgt gttgaatcag aaagagcaat attaataaca 420
gaatcatttta aacaaacaga aggccagcca gcaattttta gaagagcatt ggcattgaaa 480
cacatacttg aaaatatccc tataacaatt agagatcaag aacttatagt gggaagttta 540
actaaagaac caaggtcttc acaagtatct cctgagtttt ctaataagt gttacaagat 600
5 gaattggata gattaaataa gagaactgga gatgcattcc aaatttcaga agaaagtaaa 660
gaaaaattaa aagatgtctt tgagtattgg aatggaaaga caacaagtga gttagcaact 720
tcatatatga cagaggaaac aagagaggca gttaaattgtg aagtatttac ttaggaaac 780
tactattata atggcgtagg acatgtatct gtagattatg gaaaagtatt aagggttgga 840
tttaattggga ttataaatga ggctaaggaa caattagaaa aaaacaggag tatagatcct 900
10 gattttataa agaaagaaaa attcctaaat agtgttatta tctcatgca agctgcaata 960
acatatgtaa atagatatgc taaaaaggct aaagagattg cagataatac aagtgatgca 1020
aaaagaaaag ctgaattaaa tgaaatagca aaaatttggt caaaagtttc aggagagggga 1080
gctaaatctt tctatgaagc atgtcaatta ttttggttta ttcattgcaat aataaatata 1140
gaatctaattg gacattctat ttctccagct agatttgatc aatacatgta tccatattat 1200
15 gaaaatgata aaaatataac agataagttt gctcaagaat taatagattg tatctggatt 1260
aaattaaatg atattaataa agtaagagat gagatttcaa ctaaacattt tgggtggttac 1320
ccaatgtatc aaaaattaat tgttgggggt caaaattcag aaggaaaaga tgcaactaat 1380
aaagtatcat atatggcatt agaagcagct gtccatgtaa agttgcctca gccatctttg 1440
tcagtaagaa tatggaataa gactccagat gaatttttgc ttagagcagc agaattaact 1500
20 agagaagggg taggacttcc tgcttattat aatgatgaag ttattattcc agcattagtt 1560
tctagagggtc ttacattaga agatgcaaga gactacggaa taattggatg tgttgaacca 1620
caaaagccag gaaaaacaga aggatggcat gattcagcat tctttaatct tgcaagaata 1680
gtagagttaa ctataaatc tggatttgat aaaaataaac agattggacc taaaactcaa 1740
aattttgaag aaatgaaatc ctttgatgaa ttcattgaaag cttataaagc tcaaatggag 1800
25 tattttgtaa aacatatgtg ctgtgctgat aattgcatag atattgcaca tgcagaaaga 1860
gctccattac ctttcttgat atcaatgggt gataattgta tcggaaaagg aaagagcctt 1920
caagatgggtg gtgcagaata taacttcagt ggaccacaag gtgttgagat agctaattat 1980
ggagattcat tagttgcagt taaaaaatt gtgtttgatg aaaataagat tactccttca 2040
gaattaaaga aaacattaaa taatgatttt aaaaattcag aagaaataca agccttacta 2100
30 aaaaatgctc ctaagtttgg aaatgatatt gatgaagttg ataatttagc tagagagggg 2160
gcattagtat actgtagaga agttaataaa tatacaaatc caaggggagg aaattttcaa 2220
ccaggattat atccatcttc aattaatgta tattttggaa gcttaacagg tgctactcca 2280
gatggaagga aatccggaca accattagct gatgggggtt ctccatcaag aggctgtgat 2340
gtatctggac ctactgcagc ttgtaactca gttagtaaat tagatcattt tatagcttca 2400
35 aatggaactt tatttaatac aaaattccat ccgtcagcat taaaaggtga taatggatta 2460

atgaatttat catcattaat aagaagttat tttgatcaaa agggatttca tgttcaattt 2520
 aatgtaatat ataaaaaaat attacttgca gcacaaaaaa atcctgaaaa atatcaagat 2580
 ttaattgtta gagttgcagg atatatgtgca cagttcattt ctttagataa atctattcaa 2640
 aatgatatta ttgcaagaac tgaacatggt atgtaaagac agctttttaa ggggataaaa 2700
 5 gtaatgagta aggagataaa aggcgtttta ttaacatac aaaaattttc gttacatgat 2760
 gggcctggaa taagaactat agtatttttt aagggatggt caatgtcgtg cttatggtgc 2820
 agtaatccag aatcccaaga tattaacact caagtaatgt ttaataaaaa tttatgtaca 2880
 aatgtggaa gatgtaaatc tcaatgtaaa agtgcaggta ttgatatgaa ttcagaatat 2940
 aggatagata aaagcaaagtg tacagagtgt acaaaatgtg ttgataattg ctttaagcggg 3000
 10 gcacttggtta ttgaaggaag gaattacagt gttgaagacg ttataaagga attgaaaaaa 3060
 gatagtgttc aatatagaag atcaaacggt ggaattacac tatctggagg ggaagtatta 3120
 cttcaaccag attttgcagt ggagctttta aaagagtgt aatcatatgg ctggcacact 3180
 gccattgaaa cagcaatgta tgttaatatg gaatctgtaa aaaaagtaat tccatatata 3240
 gatctggcta tgattgatat aaaaagtatg aatgatgaaa tccataggaa atttacagga 3300
 15 gtgagtaacg aaataatatt acaaaacatt aaattaagt atgaattagc taaagaaata 3360
 ataatacaga ttctgtaat agaaggattt aatgcagatt taaaaagtat aggagcaata 3420
 gctcaatttt caaaatcatt aacaaatctt aaaagaatag atcttcttcc ataccataat 3480
 tatggagaaa ataagtatca agcaattgga agagagtatt ctttgaaaga actaaaatca 3540
 cctagtaaag acaaaatgga aagattaaaa gcttttagttg aaatcatggg aataccgtgc 3600
 20 acaattggag ctgagtaata gtagctttac atcagatatt ttaaaaacaa ttttaaatta 3660
 aaaggagaag attgcatatg agaagtatg attattttagt accaagtgt aactttatgg 3720
 gagcaaattc agtatcagta gtaggtgaaa gatgcaaat attaggtgga aaaaagcat 3780
 tgatagttac agataagttt ctaaaagata tggaagggtg agctgttgaa ttaacagtta 3840
 aatatttaaa agaagctgga ttagatgttg tatattatga cggagttgaa ccaaatccaa 3900
 25 aagatgttaa tgttatagaa ggattaaaaa tatttaaaaga agaaaattgt gacatgatag 3960
 taactgtagg tggaggaagt tcgcatgatt gcggttaaggg aataggaatt gctgcaacac 4020
 atgaaggaga tctttatgat tatgcaggaa tagaaacact tgtcaatcca ttgccaccaa 4080
 tagtagctgt aaatactact gcaggaactg ctagtgaatt aactcgtcat tgtgtattga 4140
 ctaatacaaa aaagaaaata aaatttggtta tagtttagctg gagaaatttg cctctagtat 4200
 30 ctataaatga tccaatgctt atgggtcaaaa aacctgcagg attaacagca gctacaggaa 4260
 tggatgcttt aacacatgca atagaagcat atgtatcaaa agatgcaa atccagtaacag 4320
 atgcttcagc aatacaagct attaaattaa tttcacaaaa tttaagacaa gctgtagctt 4380
 taggagaaaa tcttgaagca agagaaaata tggcttatgc atcattacta gcaggaatgg 4440
 catttaataa tgctaattta ggatatgtac atgcaatggc tcatcaatta gggggactgt 4500
 35 atgatatggc acatggtgtt gctaattgcaa tgctattacc acatgttgaa cgttataata 4560

tgctatcaaa tcctaagaag tttgcagata tagcagaatt tatgggagaa aatatatctg 4620
 gacttttctgt aatggaagca gcagagaaag ccataaatgc aatgttcagg ctttcagagg 4680
 atgttggaat tccgaaaagt ctaaaggaga tgggagtga acaagaagat tttgagcata 4740
 tggcagaact agctctttta gatggaaatg ccttttagcaa tccaagaaaa ggaaatgcaa 4800
 5 aagatattat aaatatTTTT aaggctgctt attaattaat actattttaa ggattcaaag 4860
 taaaagataa aagatatata tattagattt aagattttat tataggctaa caacaaagaa 4920
 caagttaagt attaaactta gcttggttctt tgttgtttat ttt 4963

10 <210> 6

<211> 787

<212> PRT

<213> Clostridium butyricum

15 <400> 6

Met Ile Ser Lys Gly Phe Ser Thr Gln Thr Glu Arg Ile Asn Ile Leu

1 5 10 15

Lys Ala Gln Ile Leu Asn Ala Lys Pro Cys Val Glu Ser Glu Arg Ala

20 20 25 30

Ile Leu Ile Thr Glu Ser Phe Lys Gln Thr Glu Gly Gln Pro Ala Ile

35 40 45

25 Leu Arg Arg Ala Leu Ala Leu Lys His Ile Leu Glu Asn Ile Pro Ile

50 55 60

Thr Ile Arg Asp Gln Glu Leu Ile Val Gly Ser Leu Thr Lys Glu Pro

65 70 75 80

30

Arg Ser Ser Gln Val Phe Pro Glu Phe Ser Asn Lys Trp Leu Gln Asp

85 90 95

Glu Leu Asp Arg Leu Asn Lys Arg Thr Gly Asp Ala Phe Gln Ile Ser

35 100 105 110

Glu Glu Ser Lys Glu Lys Leu Lys Asp Val Phe Glu Tyr Trp Asn Gly
 115 120 125

5 Lys Thr Thr Ser Glu Leu Ala Thr Ser Tyr Met Thr Glu Glu Thr Arg
 130 135 140

Glu Ala Val Asn Cys Glu Val Phe Thr Val Gly Asn Tyr Tyr Tyr Asn
 145 150 155 160

10 Gly Val Gly His Val Ser Val Asp Tyr Gly Lys Val Leu Arg Val Gly
 165 170 175

Phe Asn Gly Ile Ile Asn Glu Ala Lys Glu Gln Leu Glu Lys Asn Arg
 15 180 185 190

Ser Ile Asp Pro Asp Phe Ile Lys Lys Glu Lys Phe Leu Asn Ser Val
 195 200 205

20 Ile Ile Ser Cys Glu Ala Ala Ile Thr Tyr Val Asn Arg Tyr Ala Lys
 210 215 220

Lys Ala Lys Glu Ile Ala Asp Asn Thr Ser Asp Ala Lys Arg Lys Ala
 225 230 235 240

25 Glu Leu Asn Glu Ile Ala Lys Ile Cys Ser Lys Val Ser Gly Glu Gly
 245 250 255

Ala Lys Ser Phe Tyr Glu Ala Cys Gln Leu Phe Trp Phe Ile His Ala
 30 260 265 270

Ile Ile Asn Ile Glu Ser Asn Gly His Ser Ile Ser Pro Ala Arg Phe
 275 280 285

	Asp	Gln	Tyr	Met	Tyr	Pro	Tyr	Tyr	Glu	Asn	Asp	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	
	290									295							300
5	Lys	Phe	Ala	Gln	Glu	Leu	Ile	Asp	Cys	Ile	Trp	Ile	Lys	Leu	Asn	Asp	
	305									310							315 320
	Ile	Asn	Lys	Val	Arg	Asp	Glu	Ile	Ser	Thr	Lys	His	Phe	Gly	Gly	Tyr	
																	325 330 335
10	Pro	Met	Tyr	Gln	Lys	Leu	Ile	Val	Gly	Gly	Gln	Asn	Ser	Glu	Gly	Lys	
																	340 345 350
	Asp	Ala	Thr	Asn	Lys	Val	Ser	Tyr	Met	Ala	Leu	Glu	Ala	Ala	Val	His	
15																	355 360 365
	Val	Lys	Leu	Pro	Gln	Pro	Ser	Leu	Ser	Val	Arg	Ile	Trp	Asn	Lys	Thr	
																	370 375 380
20	Pro	Asp	Glu	Phe	Leu	Leu	Arg	Ala	Ala	Glu	Leu	Thr	Arg	Glu	Gly	Leu	
	385																390 395 400
	Gly	Leu	Pro	Ala	Tyr	Tyr	Asn	Asp	Glu	Val	Ile	Ile	Pro	Ala	Leu	Val	
																	405 410 415
25	Ser	Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	Glu	Asp	Ala	Arg	Asp	Tyr	Gly	Ile	Ile	Gly	
																	420 425 430
	Cys	Val	Glu	Pro	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Thr	Glu	Gly	Trp	His	Asp	Ser	
30																	435 440 445
	Ala	Phe	Phe	Asn	Leu	Ala	Arg	Ile	Val	Glu	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	Gly	
																	450 455 460

	Phe Asp Lys Asn Lys Gln Ile Gly Pro Lys Thr Gln Asn Phe Glu Glu	
	465	470 475 480
5	Met Lys Ser Phe Asp Glu Phe Met Lys Ala Tyr Lys Ala Gln Met Glu	
		485 490 495
	Tyr Phe Val Lys His Met Cys Cys Ala Asp Asn Cys Ile Asp Ile Ala	
		500 505 510
10	His Ala Glu Arg Ala Pro Leu Pro Phe Leu Ser Ser Met Val Asp Asn	
		515 520 525
	Cys Ile Gly Lys Gly Lys Ser Leu Gln Asp Gly Gly Ala Glu Tyr Asn	
15		530 535 540
	Phe Ser Gly Pro Gln Gly Val Gly Val Ala Asn Ile Gly Asp Ser Leu	
		545 550 555 560
20	Val Ala Val Lys Lys Ile Val Phe Asp Glu Asn Lys Ile Thr Pro Ser	
		565 570 575
	Glu Leu Lys Lys Thr Leu Asn Asn Asp Phe Lys Asn Ser Glu Glu Ile	
		580 585 590
25	Gln Ala Leu Leu Lys Asn Ala Pro Lys Phe Gly Asn Asp Ile Asp Glu	
		595 600 605
	Val Asp Asn Leu Ala Arg Glu Gly Ala Leu Val Tyr Cys Arg Glu Val	
30		610 615 620
	Asn Lys Tyr Thr Asn Pro Arg Gly Gly Asn Phe Gln Pro Gly Leu Tyr	
		625 630 635 640

Pro Ser Ser Ile Asn Val Tyr Phe Gly Ser Leu Thr Gly Ala Thr Pro
 645 650 655

5 Asp Gly Arg Lys Ser Gly Gln Pro Leu Ala Asp Gly Val Ser Pro Ser
 660 665 670

Arg Gly Cys Asp Val Ser Gly Pro Thr Ala Ala Cys Asn Ser Val Ser
 675 680 685

10 Lys Leu Asp His Phe Ile Ala Ser Asn Gly Thr Leu Phe Asn Gln Lys
 690 695 700

Phe His Pro Ser Ala Leu Lys Gly Asp Asn Gly Leu Met Asn Leu Ser
 15 705 710 715 720

Ser Leu Ile Arg Ser Tyr Phe Asp Gln Lys Gly Phe His Val Gln Phe
 725 730 735

20 Asn Val Ile Asp Lys Lys Ile Leu Leu Ala Ala Gln Lys Asn Pro Glu
 740 745 750

Lys Tyr Gln Asp Leu Ile Val Arg Val Ala Gly Tyr Ser Ala Gln Phe
 755 760 765

25 Ile Ser Leu Asp Lys Ser Ile Gln Asn Asp Ile Ile Ala Arg Thr Glu
 770 775 780

His Val Met

30 785

<210> 7

<211> 304

<212> PRT

5 <213> Clostridium butyricum

<400> 7

Met Ser Lys Glu Ile Lys Gly Val Leu Phe Asn Ile Gln Lys Phe Ser

1 5 10 15

10

Leu His Asp Gly Pro Gly Ile Arg Thr Ile Val Phe Phe Lys Gly Cys

20 25 30

Ser Met Ser Cys Leu Trp Cys Ser Asn Pro Glu Ser Gln Asp Ile Lys

15 35 40 45

Pro Gln Val Met Phe Asn Lys Asn Leu Cys Thr Lys Cys Gly Arg Cys

50 55 60

20 Lys Ser Gln Cys Lys Ser Ala Gly Ile Asp Met Asn Ser Glu Tyr Arg

65 70 75 80

Ile Asp Lys Ser Lys Cys Thr Glu Cys Thr Lys Cys Val Asp Asn Cys

85 90 95

25

Leu Ser Gly Ala Leu Val Ile Glu Gly Arg Asn Tyr Ser Val Glu Asp

100 105 110

Val Ile Lys Glu Leu Lys Lys Asp Ser Val Gln Tyr Arg Arg Ser Asn

30 115 120 125

Gly Gly Ile Thr Leu Ser Gly Gly Glu Val Leu Leu Gln Pro Asp Phe

130 135 140

Ala Val Glu Leu Leu Lys Glu Cys Lys Ser Tyr Gly Trp His Thr Ala
 145 150 155 160

5 Ile Glu Thr Ala Met Tyr Val Asn Ser Glu Ser Val Lys Lys Val Ile
 165 170 175

Pro Tyr Ile Asp Leu Ala Met Ile Asp Ile Lys Ser Met Asn Asp Glu
 180 185 190

10 Ile His Arg Lys Phe Thr Gly Val Ser Asn Glu Ile Ile Leu Gln Asn
 195 200 205

Ile Lys Leu Ser Asp Glu Leu Ala Lys Glu Ile Ile Ile Arg Ile Pro
 15 210 215 220

Val Ile Glu Gly Phe Asn Ala Asp Leu Gln Ser Ile Gly Ala Ile Ala
 225 230 235 240

20 Gln Phe Ser Lys Ser Leu Thr Asn Leu Lys Arg Ile Asp Leu Leu Pro
 245 250 255

Tyr His Asn Tyr Gly Glu Asn Lys Tyr Gln Ala Ile Gly Arg Glu Tyr
 260 265 270

25 Ser Leu Lys Glu Leu Lys Ser Pro Ser Lys Asp Lys Met Glu Arg Leu
 275 280 285

Lys Ala Leu Val Glu Ile Met Gly Ile Pro Cys Thr Ile Gly Ala Glu
 30 290 295 300

<210> 8
 <211> 385
 35 <212> PRT

<213> Clostridium butyricum

<400> 8

	Met	Arg	Met	Tyr	Asp	Tyr	Leu	Val	Pro	Ser	Val	Asn	Phe	Met	Gly	Ala
5	1							5							10	15
	Asn	Ser	Val	Ser	Val	Val	Gly	Glu	Arg	Cys	Lys	Ile	Leu	Gly	Gly	Lys
					20					25					30	
10	Lys	Ala	Leu	Ile	Val	Thr	Asp	Lys	Phe	Leu	Lys	Asp	Met	Glu	Gly	Gly
					35					40					45	
	Ala	Val	Glu	Leu	Thr	Val	Lys	Tyr	Leu	Lys	Glu	Ala	Gly	Leu	Asp	Val
			50					55					60			
15	Val	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Val	Glu	Pro	Asn	Pro	Lys	Asp	Val	Asn	Val	Ile
		65					70				75				80	
	Glu	Gly	Leu	Lys	Ile	Phe	Lys	Glu	Glu	Asn	Cys	Asp	Met	Ile	Val	Thr
20						85				90					95	
	Val	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	His	Asp	Cys	Gly	Lys	Gly	Ile	Gly	Ile	Ala
					100					105				110		
25	Ala	Thr	His	Glu	Gly	Asp	Leu	Tyr	Asp	Tyr	Ala	Gly	Ile	Glu	Thr	Leu
					115					120				125		
	Val	Asn	Pro	Leu	Pro	Pro	Ile	Val	Ala	Val	Asn	Thr	Thr	Ala	Gly	Thr
					130					135				140		
30	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Arg	His	Cys	Val	Leu	Thr	Asn	Thr	Lys	Lys	Lys
					145				150				155		160	
	Ile	Lys	Phe	Val	Ile	Val	Ser	Trp	Arg	Asn	Leu	Pro	Leu	Val	Ser	Ile
35										165			170		175	

	Asn Asp Pro Met Leu Met Val Lys Lys Pro Ala Gly Leu Thr Ala Ala		
	180	185	190
5	Thr Gly Met Asp Ala Leu Thr His Ala Ile Glu Ala Tyr Val Ser Lys		
	195	200	205
	Asp Ala Asn Pro Val Thr Asp Ala Ser Ala Ile Gln Ala Ile Lys Leu		
	210	215	220
10	Ile Ser Gln Asn Leu Arg Gln Ala Val Ala Leu Gly Glu Asn Leu Glu		
	225	230	235 240
	Ala Arg Glu Asn Met Ala Tyr Ala Ser Leu Leu Ala Gly Met Ala Phe		
15	245	250	255
	Asn Asn Ala Asn Leu Gly Tyr Val His Ala Met Ala His Gln Leu Gly		
	260	265	270
20	Gly Leu Tyr Asp Met Ala His Gly Val Ala Asn Ala Met Leu Leu Pro		
	275	280	285
	His Val Glu Arg Tyr Asn Met Leu Ser Asn Pro Lys Lys Phe Ala Asp		
	290	295	300
25	Ile Ala Glu Phe Met Gly Glu Asn Ile Ser Gly Leu Ser Val Met Glu		
	305	310	315 320
	Ala Ala Glu Lys Ala Ile Asn Ala Met Phe Arg Leu Ser Glu Asp Val		
30	325	330	335
	Gly Ile Pro Lys Ser Leu Lys Glu Met Gly Val Lys Gln Glu Asp Phe		
	340	345	350

Glu His Met Ala Glu Leu Ala Leu Leu Asp Gly Asn Ala Phe Ser Asn

355

360

365

5 Pro Arg Lys Gly Asn Ala Lys Asp Ile Ile Asn Ile Phe Lys Ala Ala
375 380 370

Tyr

385

10

<210> 9

<211> 35

<212> ADN

<213> Séquence artificielle

15

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

<400> 9

20 cgcggatccg tgattggagg agtaaaaatg ataag

35

<210> 10

<211> 40

25 <212> ADN

<213> Séquence artificielle

<220>

<223> Description de la séquence artificielle:Amorce

30

<400> 10

tcccccgggg gaatccttta aatagtatta attaataagc

40

REVENDEICATIONS

1. Procédé de préparation du 1,3-propanediol à partir d'une substance carbonée, ledit procédé comportant au moins une étape de culture d'un micro-organisme recombinant dans lequel a été introduit au moins un acide nucléique codant pour les deux sous-unités d'une glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de co-enzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs:
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de co-enzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs est originaire de *Clostridium butyricum*.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de co-enzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs est une protéine dimérique composé d'un premier polypeptide ayant au moins 50% d'identité en amino acides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°6 et d'un second polypeptide ayant au moins 50% d'identité en amino acides avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO 7.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que le micro-organisme recombinant comprend en outre un acide nucléique codant une 1,3-propanediol déshydrogénase, et de manière préférée une 1,3-propanediol déhydrogénase de *Clostridium butyricum* VPI 1718.
5. Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que la 1,3-propanediol déhydrogénase est un polypeptide ayant au moins 80% d'identité en amino acides avec le polypeptide de séquence SEQ ID NO 8.

6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que l'étape de culture du micro-organisme recombinant est effectuée en l'absence de co-enzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

5

7. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 6, caractérisé en ce que la source carbonée est choisie parmi les osides et les polyols.

8. Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'oside
10 est le glucose et le polyol est le glycérol.

9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce que le micro-organisme est choisi parmi les micro-organismes ne produisant pas naturellement le co-enzyme B12 ou l'un de ses précurseurs.

15

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce qu'il s'agit d'une bactérie, d'une levure ou d'un champignon.

11. Procédé selon la revendication 10, caractérisée en ce qu'il s'agit
20 d'une bactérie appartenant au genre *Clostridium*, *Escherichia*, *Bacillus*, *Lactobacillus* ou *Lactococcus*.

12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce qu'il s'agit de la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

25

13. Procédé selon l'une des revendications 1 à 12, caractérisé en ce que le micro-organisme recombinant comprend également des acides nucléiques codant respectivement une glycérol-3-phosphate déshydrogénase et une glycérol-3-phosphatase.

30

14. Acide nucléique comprenant tout ou partie d'un polynucléotide codant pour au moins une sous-unité d'une glycérol déshydratase dont l'activité catalytique est indépendante de la présence de co-enzyme B12 ou de l'un de ses précurseurs.

5

15. Acide nucléique selon la revendication 14, caractérisé en ce qu'il comprend tout ou partie d'un polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID NO 1, ou SEQ ID N°2 ou un polynucléotide de séquence complémentaire.

10

16. Acide nucléique selon la revendication 15, caractérisé en ce qu'il comprend un premier polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°1 et un second polynucléotide ayant au moins 50% d'identité en nucléotides avec le polynucléotide de séquence SEQ ID N°2.

15

17. Acide nucléique selon la revendication 16, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une séquence à fonction de promoteur de la transcription, fonctionnelle dans la cellule hôte dans laquelle l'expression du polynucléotide est recherchée.

20

18. Acide nucléique selon la revendication 17, caractérisé en ce que la séquence promotrice est la séquence SEQ ID NO 3 ou une séquence ayant au moins 80 % d'identité en nucléotides avec cette dernière.

25

19. Acide nucléique à fonction de promoteur bactérien comprenant un polynucléotide ayant au moins 80% d'identité en nucléotides avec la séquence SEQ ID NO 3, ou un polynucléotide de séquence complémentaire.

30

20. Acide nucléique comprenant tout ou partie d'un polynucléotide codant une 1,3-propanediol déshydrogénase ayant au moins 80% d'identité

Collection Nationale de Cultures de Micro-organismes (CNCM) le 24 Juin 1999 sous le N° d'accès I-2243.

5 28. Polypeptide codé par un acide nucléique selon l'une des revendications 14 à 16, comprenant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés ayant au moins 50% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID NO 6 ou SEQ ID N°7.

10 29. Protéine dimérique composée d'un premier polypeptide ayant au moins 50% d'identité en amino-acides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°6 et d'un second polypeptide ayant au moins 50% d'identité en amino-acides avec le polypeptide de séquence SEQ ID N°7.

15 30. Polypeptide codé par un acide nucléique selon la revendication 20, comprenant tout ou partie d'une séquence d'acides aminés ayant au moins 80% d'identité en acides aminés avec la séquence SEQ ID NO 8.

20 31. Procédé de production d'un polypeptide selon l'une des revendications 28 à 29, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

a) préparation d'un vecteur d'expression recombinant selon l'une des revendications 24 à 26;

25 b) introduction du vecteur d'expression recombinant de l'étape a) dans une cellule hôte appropriée;

c) culture de la cellule hôte recombinante de l'étape b) dans un milieu de culture approprié;

30

d) récupération du polypeptide recombinant produit dans le surnageant de culture ou dans le lysat cellulaire;

e) le cas échéant, purification du polypeptide.

5

32. Anticorps dirigé contre un polypeptide selon l'une des revendications 28 à 29.

Le Mandataire
Cabinet HARLB & PHILLIP

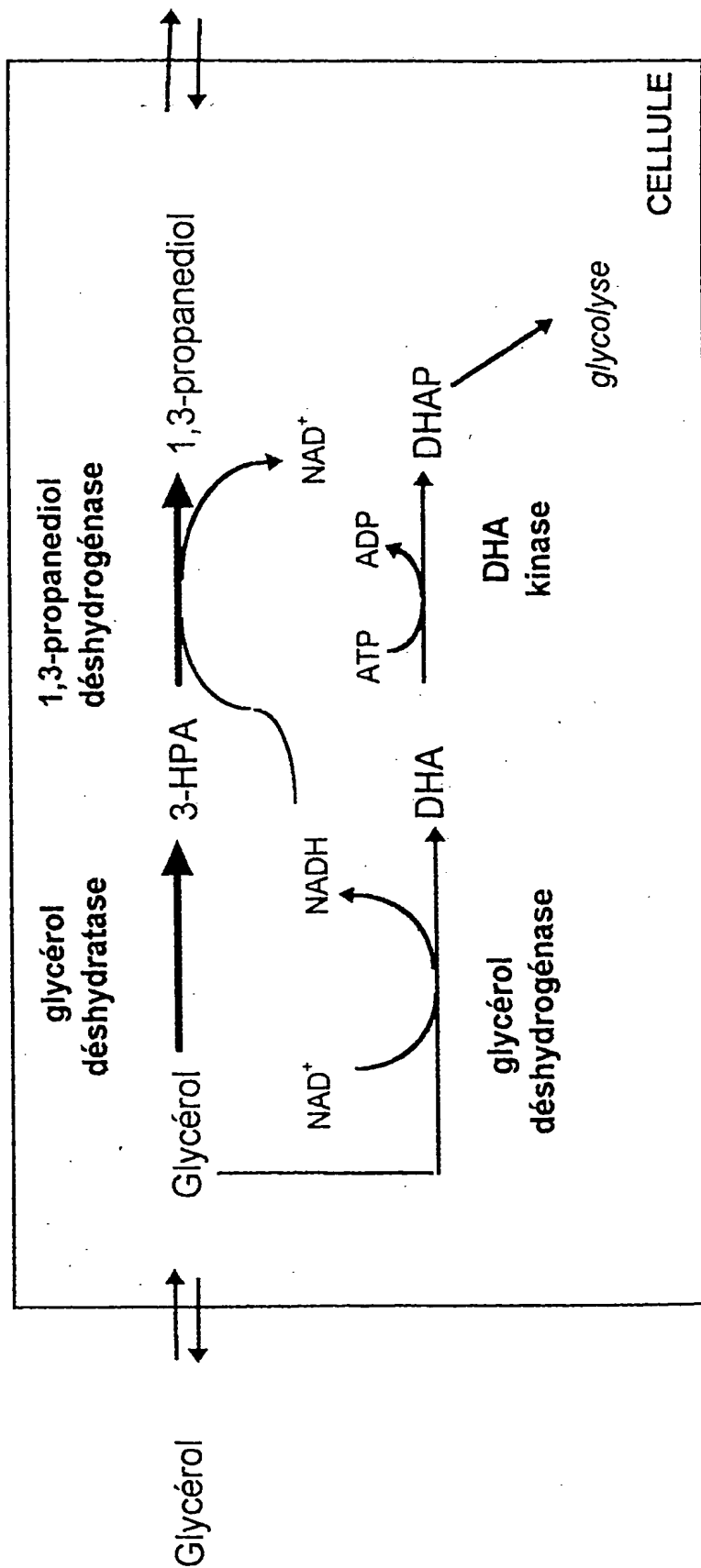


FIGURE 1

ORIGINAL

2/10

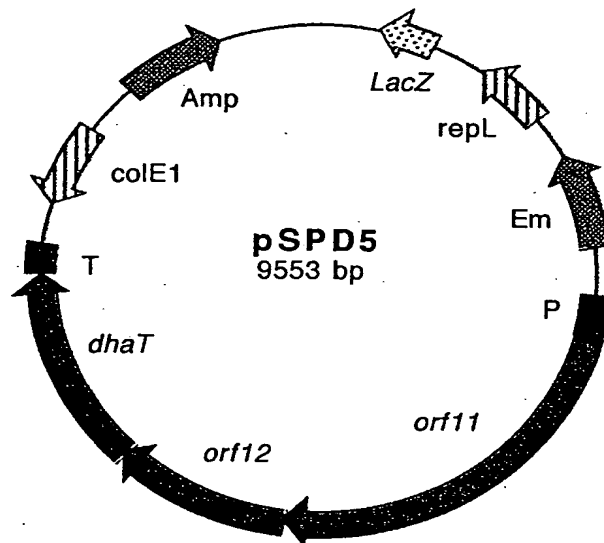


FIGURE 2

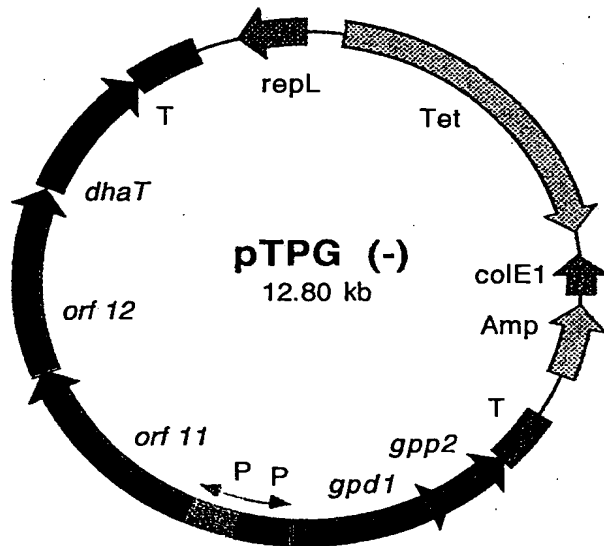


FIGURE 3

ORIGINAL

4/10

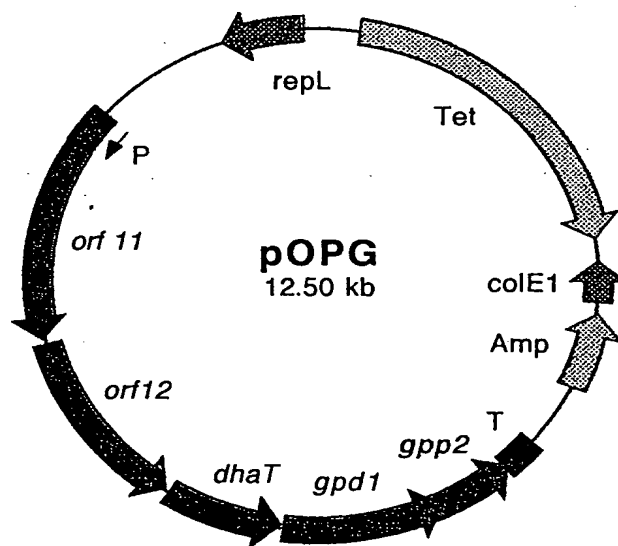


FIGURE 4

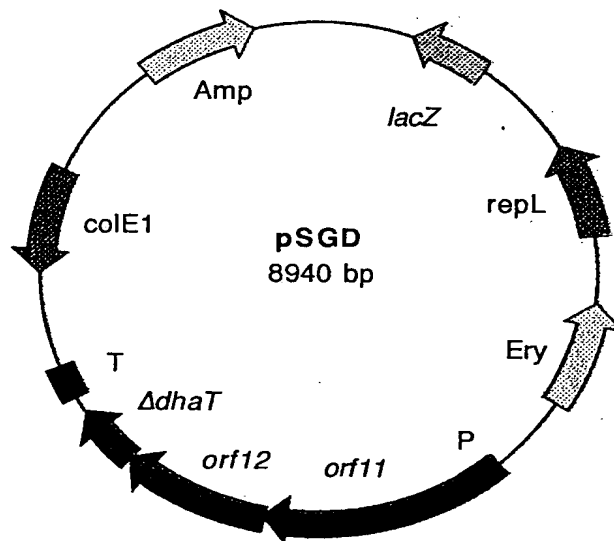


FIGURE 5

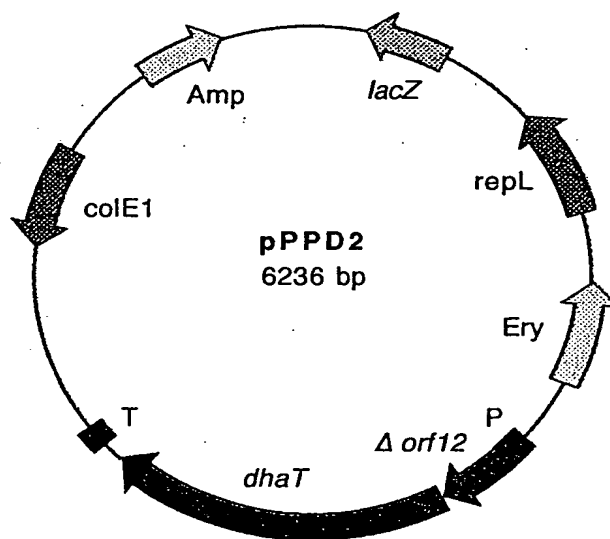


FIGURE 6

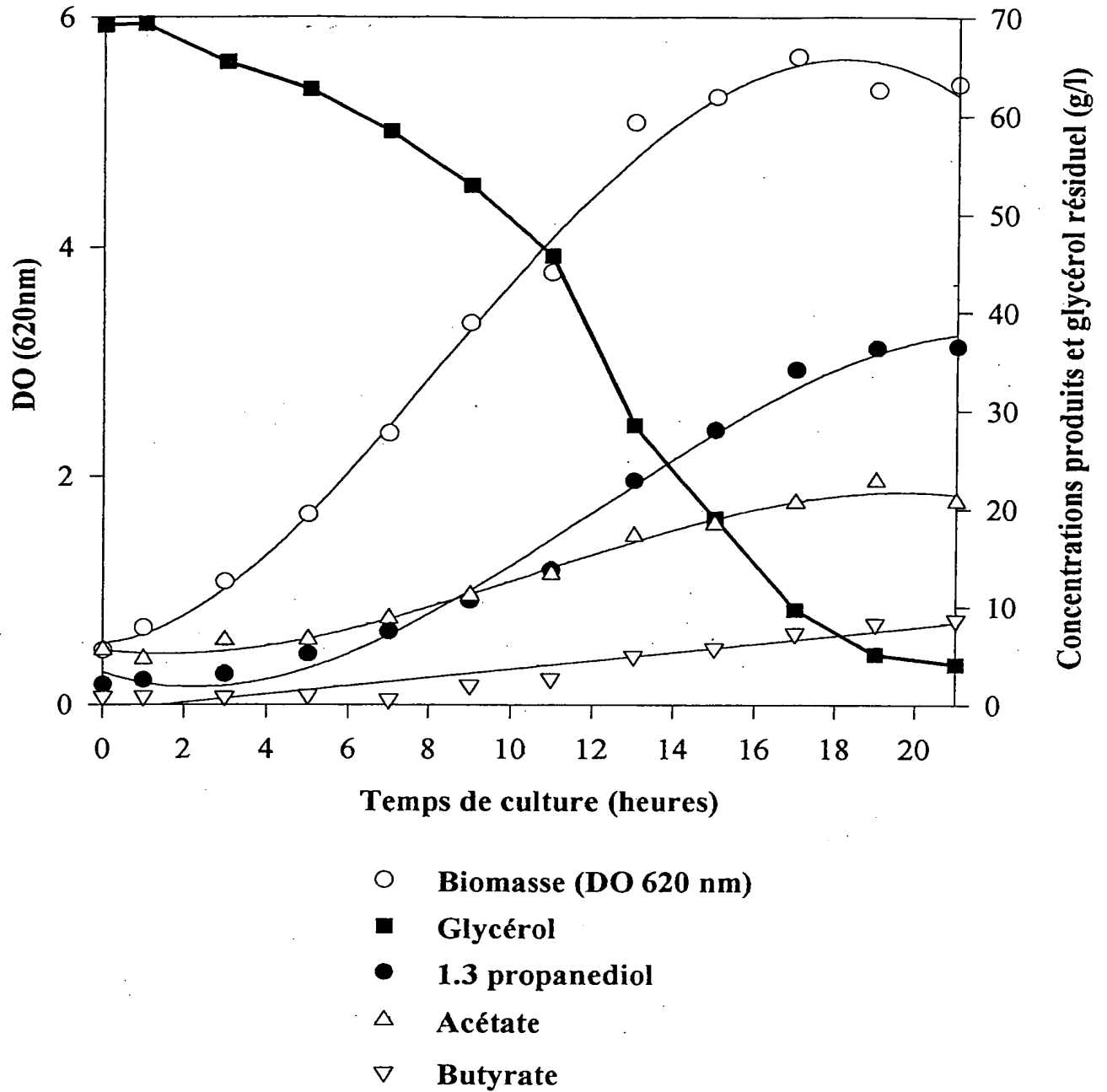


FIGURE 7

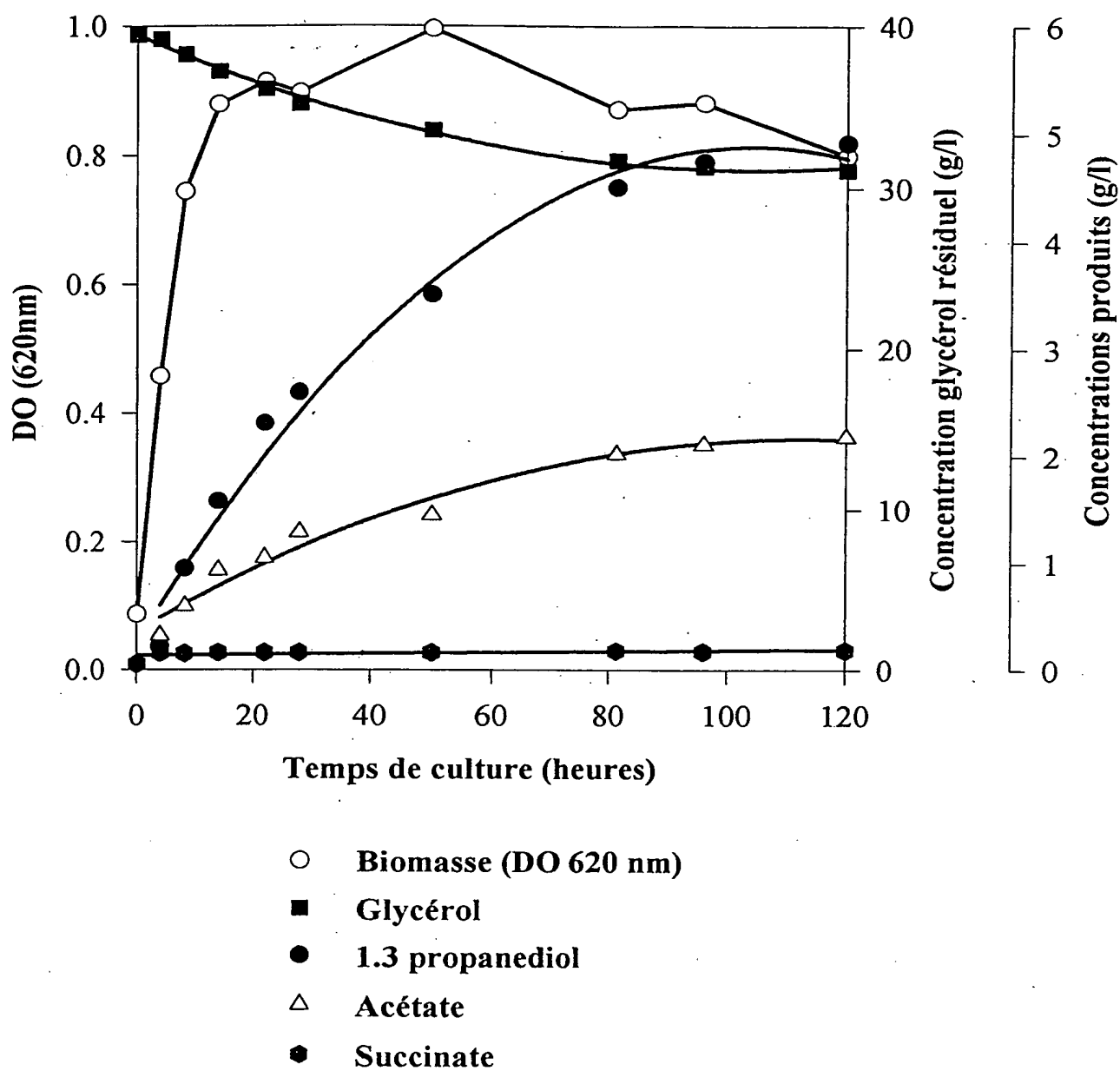


FIGURE 8

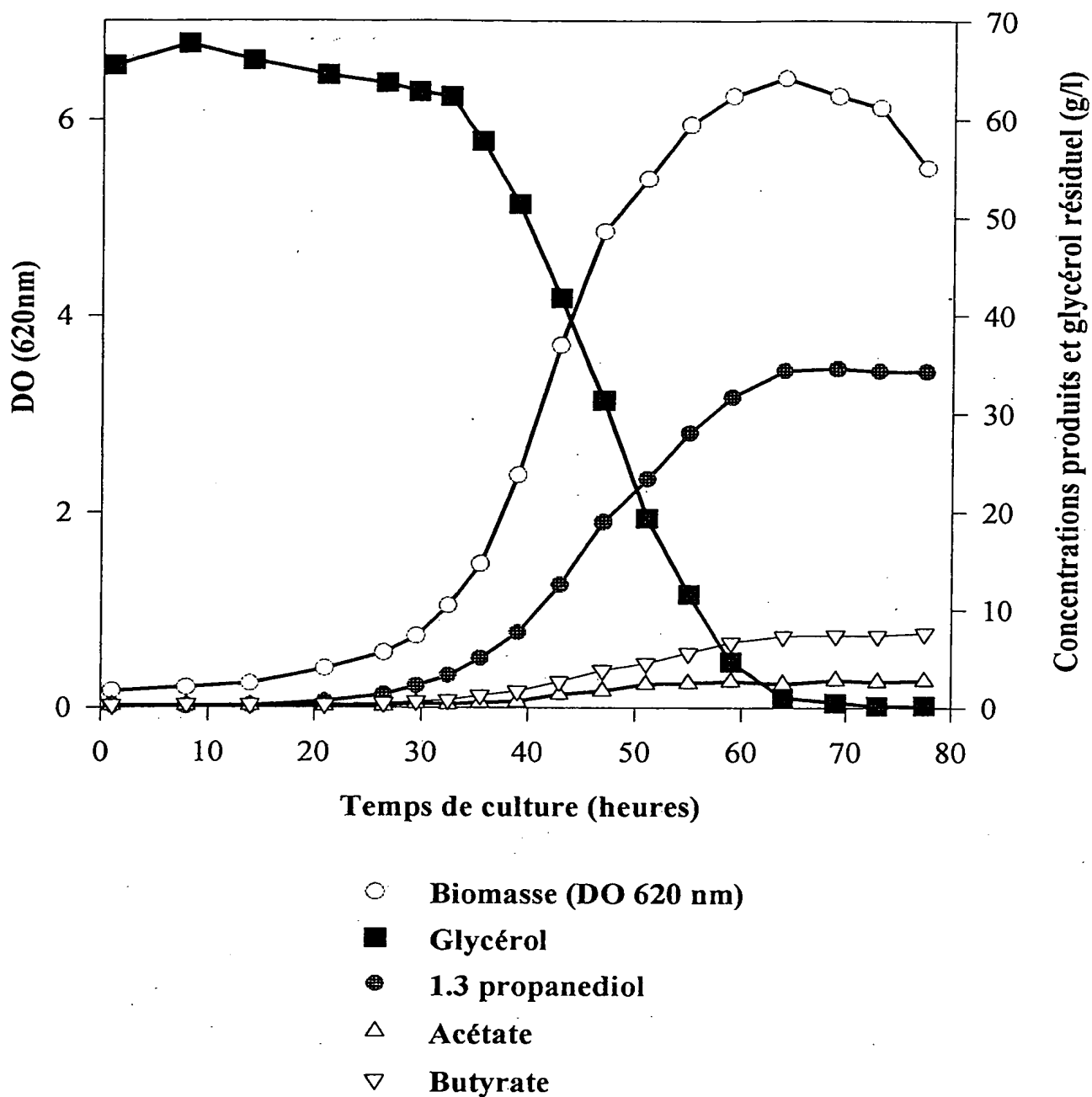


FIGURE 9

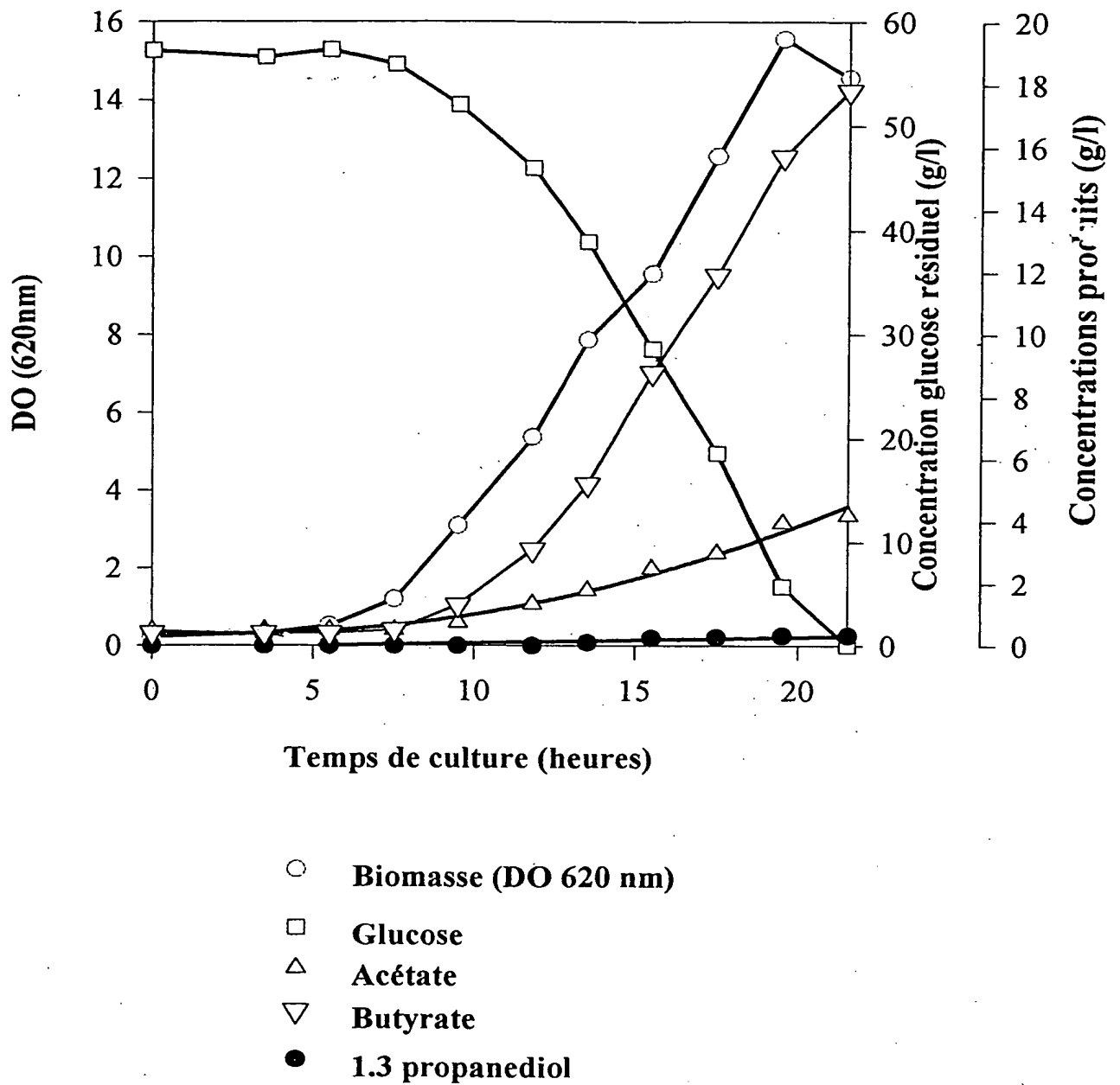


FIGURE 10